

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
CENTRE D'ORSAY

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Yaroslav de KOUCHKOVSKY

1^{re} THÈSE — INDUCTION PHOTOSYNTHÉTIQUE DES CHLOROPLASTES ISOLÉS

2^e THÈSE — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le 12 juin 1963, devant la Commission d'examen

MM. ULRICH	<i>Président</i>
MOYSE	{ <i>Examineurs</i>
LAVOREL	

PARIS

GAUTHIER-VILLARS ÉDITEUR
55, quai des Grands-Augustins

1963

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
CENTRE D'ORSAY

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Yaroslav de **KOUCHKOVSKY**

1^{re} THÈSE — INDUCTION PHOTOSYNTHÉTIQUE DES CHLOROPLASTES ISOLÉS

2^e THÈSE — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le 12 juin 1963, devant la Commission d'examen

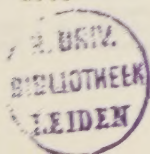
MM. ULRICH	<i>Président</i>
MOYSE	} <i>Examineurs</i>
LAVOREL	

PARIS

GAUTHIER-VILLARS ÉDITEUR

55, quai des Grands-Augustins

1963



FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen M. ZAMANSKY

PROFESSEURS :

JULIA G. T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	SCHWARTZ T	Calcul différentiel et intégral.
DE BROGLIE T	Théories physiques.	CHOUARD T	Physiologie végétale.
PRENANT T	Anatomie et Histologie comparées.	MALAVARD T	Aviation. Technique aéronautique.
GRASSÉ T	Evolution des êtres organisés.	BRELOT T	Calcul différentiel et intégral.
PRÉVOST T	Chimie organique.	NORMANT T	Synthèse organique générale.
CHAUDRON T	Chimie appliquée.	BENARD T	Chimie minérale.
WYART T	Minéralogie et Cristallographie.	BUVAT T	Botanique (E.N.S.).
TEISSIER T	Zoologie.	DUGUE T	Statistiques mathématiques
MANGENOT T	Biologie végétale (Orsay).	SOULAIRAC T	Psychophysiologie.
AUGER T	Physique quantique et Relativité.	ULRICH T	Physiologie végétale.
MONNIER T	Physiologie générale.	MARÉCHAL T	Optique théorique et appliquée.
PIVETEAU T	Paléontologie.	KIRRMANN T	Théories chimiques.
ROCARD T	Physique (E.N.S.).	CHADEFAUD T	Botanique.
CARTAN T	Mathématiques (E.N.S.).	Mlle LE BRETON T	Physiologie de la nutrition.
LAFFITTE T	Chimie générale.	SALEM T	Mathématiques générales.
FAVARD T	Géométrie supérieure.	LELONG T	Application de l'analyse à la géométrie.
COULOMBE T	Physique du globe.	DEVILLERS T	Anatomie et Histologie comparées.
Mlle COUSIN T	Biologie animale S.P.C.N.	EHRESMANN T	Topologie algébrique.
CHRÉTIEN T	Chimie minérale.	FRANCON T	Physique S.P.C.N.
DRACH T	Zoologie.	GLANGEAUD T	Géographie physique et Géologie dynamique.
KASTLER T	Physique (E.N.S.).	GODEMENT T	Mathématiques M.P.C.
EPHROSSI T	Génétique.	PISOT T	Techniques mathématiques de la physique.
RIVIERE T	Géologie S.P.C.N. et Sédimentologie.	ROCH T	Géologie.
GAUTHERET T	Biologie végétale P.C.B.	SCHATZMAN T	Astrophysique.
LUCAS R. T	Recherches physiques.	TERMIER T	Paléontologie stratigraphique.
THOMAS T	Biologie cellulaire.	ZAMANSKY T	Mathématiques générales.
ARNULF T	Optique appliquée.	LENNUIER T	Physique M.G.P.
MORAND T	Physique enseignement.	RIZET T	Génétique (Orsay).
SOEILLET T	Physique P.C.B.	ROUTHIER T	Géologie appliquée.
FORTIER T	Mécanique expérimentale des fluides.	Mme TONNELAT T	Physique théorique.
DANJON T	Astronomie.	DIXMIER T	Mathématiques M.P.C.
PETIT T	Biologie maritime.	SOUCHAY T	Chimie générale.
QUENEY T	Météorologie et Dynamique atmosphérique.	AIGRAIN T	Electrotechnique générale.
GALLIEN T	Embryologie.	BRUSSET T	Chimie systématique.
EICHORN T	Botanique.	LÉVY M. T	Physique théorique des hautes énergies (Orsay).
DE CUGNAC T	Biologie végétale S.P.C.N.	Mme CHAIX T	Chimie biologique.
Mlle CAUCHOIS T	Chimie physique.	Mme HUREL-PY T	Biologie végétale P.C.B.
THELLIER T	Physique du globe.	PIAUX T	Chimie M.P.C.
L'HERITIER T	Biologie générale (Orsay).	BRUN T	Mécanique théorique des fluides.
GRIVET T	Radioélectricité (Orsay).	LEDERER T	Chimie biologique
PONCIN T	Mécanique générale.	Mme DUBREIL T	Mathématiques Agrégation
DUBREIL T	Arithmétique et Théorie des nombres.	Mme LELONG T	Mathématiques (E.N.S.)
QUELET T	Chimie organique.	BELLAIR T	Géologie S.P.C.N.
CAGNIARD T	Géophysique appliquée.	COTTE T	Physique Electricité.
CHAMPETIER T	Chimie macromoléculaire.	DUBOIS T	Chimie organique.
CUVILLIER T	Micropaléontologie.	LAMOTTE T	Zoologie E.N.S.
JUNG T	Pétrographie.	MICHEL A. T	Chimie minérale (Orsay).
TRILLAT T	Microscopie et Diffraction électronique.	OLMER T	Energetique générale.
WIEMANN T	Chimie organique et structurale.	ROUAULT T	Electricité (Orsay).
JACQUINOT T	Spectroscopie et physique céleste (Orsay).	GAUTHIER T	Mécanique appliquée.
VASSY T	Physique de l'atmosphère.	BACHEWITZ T	Chimie physique.
DESTOUCHES T	Théories physiques.	BROSSEL T	Physique atomique.
AMIEL T	Chimie générale.	BUSER T	Physiologie comparée.
HOCART T	Minéralogie et Cristallographie.	CAMUS T	Physiologie végétale B.M.P.V.
MATHIEU T	Physique Optique.	CASTAING T	Physique (Orsay).
COUTEAUX T	Biologie animale P.C.B.	CURIEN T	Minéralogie et Cristallographie.
MAY T	Zoologie (Orsay).	MOYSE T	Physiologie végétale (Orsay).
CHOQUET T	Théorie des fonctions et Topologie.	NOIROT T	Evolution des êtres organisés.
FELDMANN T	Biologie végétale marine.	PANNETIER T	Chimie générale (Orsay).
GUINIER T	Physique du solide (Orsay).	POSSOMPES T	Zoologie.
JOST T	Physiologie comparée.		
FORTET T	Calcul des probabilités et Physique mathématique.		

PULLMANN	T	Chimie théorique.	ELLENBERGER	Géologie appliquée sur le terrain.
TEILLAC	T	Physique nucléaire et Radioactivité.	FRANC	Biologie animale P.C.B.
TONNELAT	T	Biologie physico-chimique.	SCHNELL	Botanique tropicale (Orsay).
VILLE	T	Econométrie.	STOLKOWSKI	Physiologie générale.
WILLEMART	T	Chimie P.C.B.	ACHER	Chimie biologique (Orsay).
DODE	T	Chimie (Orsay).	BAUDOIN	Biologie animale P.C.B.
FREYMANN	T	Recherches physiques.	BEAUMONT	Biologie animale S.P.C.N.
GUINOCHE	T	Biologie végétale S.P.C.N. (Orsay).	BLAMONT	Géophysique ionosphère.
ROLLET	T	Chimie P.C.B.	BOURREAU	Botanique.
Mlle JOSIEN	T	Chimie S.P.C.N.	CURIE	Physique M.G.P.
CHEVALLEY	T	Géométrie algébrique et Théorie des groupes.	DURAND-DELGA	Géologie.
ARNOULT	T	Electronique (Orsay).	FREON	T Chimie organique (Orsay).
CHAFELLE	T	Physique (Orsay).	HELLER	Physiologie végétale.
DELANGE	T	Mathématiques (Orsay).	TORTRAT	Calcul des probabilités.
DENY	T	Mathématiques générales (Orsay).	CAILLEUX	Géologie S.P.C.N.
GERMAIN	T	Mécanique théorique des fluides.	MAGNAN	T Physique S.P.C.N.
LUCAS G.	T	Géologie.	DAUDEL	T Mécanique ondulatoire appliquée à la Chimie théorique et à la Physique nucléaire.
ALLARD	T	Chimie physique.	Mlle FOURCROY ...	Biologie végétale S.P.C.N.
BERTHELOT	T	Physique fondamentale des hautes énergies (Orsay).	Mme CHOQUET- BRUHAT	T Mécanique analytique et Mécanique céleste.
BRICART	T	Météorologie et Physique de l'atmosphère.	Mlle WEIL	Physiologie générale.
Mme ALBE-FESSARD		Psychophysiologie.	LWOFF	T Microbiologie.
FRIEDEL		Physique du solide (Orsay).	SIESTRUNCK	T Mécanique physique et expérimentale.
JULIA M.		Etudes des molécules naturelles complexes.	LACOMBE	T Métallurgie des métaux nucléaires.
LENDER	T	Biologie animale S.P.C.N. (Orsay).	BROCHARD	T Physique M.P.C. (Orsay).
MAGAT		Physico-chimie des radioéléments.	CABANNES	T Mécanique générale.
Mlle QUINTIN	T	Electrochimie.	LESIEUR	T Mathématiques M.P.C. (Orsay).
MONOD	T	Chimie du métabolisme.	MAZET	T Mécanique générale (Orsay).
BENOIT	T	Physiologie animale (Orsay).	CAIRE	Géographie physique et Géologie dynamique.
DE POSSEL	T	Analyse numérique.	COMOLET	Mécanique des fluides.
CHARLOT	T	Chimie analytique.	CORABOEUF	Physiologie animale.
HAISSINSKY	T	Radiochimie.	DELLOUE	Physique de l'exosphère.
LEME	T	Physiologie végétale B.M.-P.V. (Orsay).	GORENFLOT	Biologie végétale.
GUERIN	T	Chimie M.P.C. (Orsay).	HOULLON	Biologie animale P.C.B.
CHATELET	T	Chimie P.C.B.	JULLIEN	Chimie M.P.C. (Orsay).
JEAN	T	Physique nucléaire (Orsay).	MALGRANGE	T.M.P. (Orsay).
MATTLER	T	Physique S.P.C.N.	OLIVIER	Anthropologie.
MICHEL L.		Physique théorique des hautes énergies (Orsay).	NOZERAN	T Botanique II (Orsay).
BERGERARD		Zoologie (Orsay).	BLANC-LAPIERRE	Physique (E.N.S. Orsay).
BERTIN		Electronique (Orsay).	CHEVAUGEON	T Botanique (Orsay).
BOUSSIÈRES		Chimie des radioéléments (Orsay).	KAHANE	T Mathématiques (Orsay).
Mme COUTURE ...		Thermodynamique et Mécanique physique.	SANUEL	T Mathématiques (E.N.S. féminine).
			KOURGANOFF	T Astronomie (Orsay).
			THIRY	T Mécanique céleste.

Secrétaire général R. POUILLAIN



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Induction photosynthétique des chloroplastes isolés

Yaroslav DE KOUCHKOVSKY

Laboratoire de Photosynthèse du C.N.R.S., Gif-sur-Yvette (S.-et-O.) France

(Manuscrit reçu le 15 mars 1963)

RÉSUMÉ

Des chloroplastes, isolés en milieu aqueux, et sans réactif de HILL montrent, à l'illumination, un *jet* d'oxygène. Ce jet est suivi d'une photoabsorption d'oxygène prolongée. Lors de l'interruption de l'éclairement, on constate une augmentation transitoire de la vitesse d'absorption d'oxygène qui diminue ensuite pour tendre asymptotiquement vers une valeur constante. Une nouvelle illumination provoque l'apparition d'un nouveau jet, dont l'amplitude augmente avec l'intervalle d'obscurité. Ces phénomènes ont été principalement étudiés avec des chloroplastes isolés de feuilles de *Zea Mays* L. mais ont été retrouvés avec d'autres espèces.

L'action du pH, de la température et de différents facteurs chimiques (transporteurs d'électrons, catalase, inhibiteurs) a permis de distinguer plusieurs étapes fondamentales liées entre elles dans un cycle. Il a été également possible de déterminer les caractéristiques cinétiques des étapes. Ce mécanisme est formellement semblable à celui proposé par d'autres auteurs pour *Chlorella*.

Les quatre réactions principales du cycle sont, *successivement* :

- 1) oxydoréduction photochimique interne portant sur un *complexe initial* en concentration limitée, mesurée par le volume du jet ;
- 2) évolution du photoproduit oxydant (donnant de l'oxygène moléculaire) ;
- 3) évolution du photoproduit réducteur, aboutissant à l'accumulation d'un accepteur d'électrons réduit (dans le cas présent, d'eau oxygénée résultant de l'absorption et de la réduction de l'oxygène externe dissous) ;
- 4) reformation du complexe initial.

Un modèle cinétique est proposé permettant de construire des courbes théoriques analogues aux courbes expérimentales.

Enfin, ainsi qu'il était prévu, l'existence d'une induction de la réaction de HILL a été démontrée avec le ferricyanure mais non avec le 2,6-dichlorophénol indophénol.

En conclusion, la diversité des comportements cinétiques des organismes entiers et des chloroplastes isolés semble due, en partie au moins, aux différentes valeurs que prendrait la constante de vitesse de la réaction (3). La constante de vitesse de cette réaction dépend probablement de la nature de l'accepteur d'électrons.

SUMMARY

Chloroplasts, isolated in aqueous medium, and without HILL reagent show, upon illumination, a burst of oxygen. In continuing light this burst is followed by a long-lasting absorption of oxygen. Upon darkening there occurs a temporary increase in the rate of oxygen absorption which then decreases, approaching asymptotically a constant value. A second illumination causes the occurrence of a new burst, the amplitude of which increases with the length of the dark period. These phenomena were studied mainly with chloroplasts isolated from *Zea Mays* L. leaves but were found in other species as well.

The action of pH, temperature and substances such as inhibitors, electron carriers, catalase has helped to distinguish several fundamental steps linked together in a cycle.

It has been possible also to determine the kinetic characteristics of the steps. This mechanism is similar in form to that proposed by other authors for *Chlorella*.

The four main reactions of the cycle are, in order :

- 1) the internal photochemical oxidation-reduction of an initial complex the concentration of which is limited and is measured by the volume of the burst ;
- 2) a transformation of the oxidizing photoproduct (giving molecular oxygen) ;
- 3) a transformation of the reducing photoproduct, leading to the accumulation of a reduced electron acceptor (in the present case, of hydrogen peroxide which results from the absorption and the reduction of the external oxygen) ;
- 4) a new formation of the initial complex.

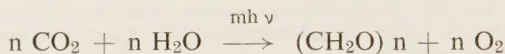
A kinetic model is proposed which permits the plotting of theoretical curves analogous to the experimental ones.

The existence of an induction of the HILL reaction was demonstrated in the case of ferricyanide but not of 2,6-dichlorophenol indophenol.

To conclude, the diversity of the kinetic behaviour of whole organisms and of isolated chloroplasts appears to be due, at least in part, to different values of the rate constant of reaction (3). The rate constant of this reaction probably depends on the nature of the electron acceptor.

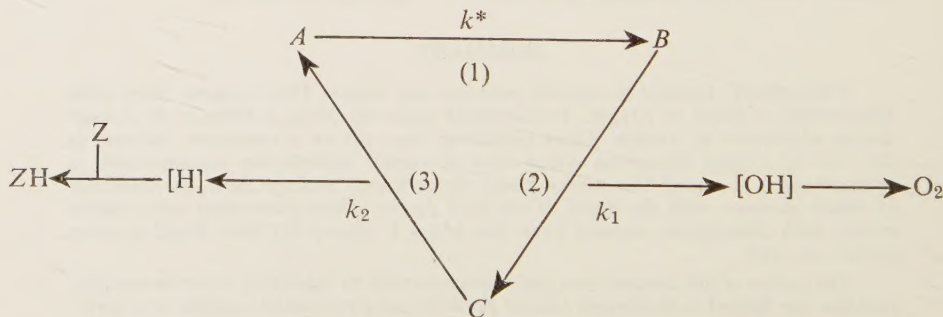
INTRODUCTION

L'équation globale de la photosynthèse :



est, en fait, l'expression simplifiée de plusieurs séquences de réactions parallèles ou successives. Si les caractéristiques cinétiques des réactions du cycle du carbone au cours de la photosynthèse et la nature des produits intermédiaires sont à l'heure actuelle bien connues (BASSHAM et CALVIN, 1957 ; CALVIN et BASSHAM, 1962), il n'en est pas de même en ce qui concerne les phénomènes précédant la réduction de l'acide phosphoglycérique en triose-phosphate. C'est toute cette phase primaire qui est particulièrement spécifique de la photosynthèse, la transformation ultérieure des chaînons carbonés suivant les voies classiques du métabolisme général.

Une des manifestations les plus nettes du fonctionnement complexe de l'appareil photosynthétique est l'apparition de variations cinétiques transitoires, ou *induction*. Ainsi, la vitesse du dégagement d'oxygène et le rendement de fluorescence de la chlorophylle subissent des modifications temporaires si l'on fait varier brusquement l'éclairement ou bien si l'on passe de l'obscurité à la lumière. Des études récentes avec *Chlorella* (LAVOREL, 1959 ; JOLIOT, 1961_a et _b) ont permis de suggérer un mécanisme cyclique de la photosynthèse pouvant se résumer ainsi :



A représenterait un *complexe* en relation avec la chlorophylle (LAVOREL, 1959) et comprenant un substrat $H\ OH$ où $[H]$ et $[OH]$ sont encore liés. La réaction photochimique (1) séparerait $[H]$ de $[OH]$ en donnant *B*. *B*, à la suite du départ du photoproduit oxydant $[OH]$ selon la réaction (2), donnerait *C*. Enfin, *C* libérerait le photoproduit réducteur $[H]$ par la réaction (3) et redonnerait *A*, après fixation du substrat $H\ OH$. Il est évident que chacune de ces trois étapes schématisées peut être plus complexe.

Un tel mécanisme rend compte correctement des phénomènes d'induction observés avec des organismes ou des organes entiers. Par contre, les chloroplastes isolés ne semblaient pas, jusqu'à présent, présenter ces propriétés, ce qui faisait douter de la validité générale du cycle proposé. Néanmoins, on verra ci-dessous que certaines observations déjà anciennes permettaient de pressentir une parenté fonctionnelle étroite entre les chloroplastes *in vitro* et les chloroplastes *in vivo*.

L'hypothèse émise au début de ce travail consistait à admettre que le fonctionnement photosynthétique des chloroplastes et celui des *Chlorelles* ne différaient pas essentiellement. Si, en particulier, la libération d'oxygène au cours de la réaction de HILL paraît s'effectuer, dès l'éclairement, à une vitesse constante, cela pourrait être dû à des caractéristiques cinétiques particulières du schéma donné ci-dessus.

On peut admettre que k^* et k_1 pour *Chlorella* sont identiques à k^* et k_1 pour des chloroplastes isolés, mais qu'il n'en est pas de même pour k_2 qui dépendrait de la nature de *Z*. Avec des feuilles ou des algues, *Z* est égal à CO_2 (globalement) ; avec des chloroplastes en réaction de HILL, *Z* est différent de CO_2 (il peut être, par exemple, un colorant comme le 2,6-dichlorophénol indophénol). En lumière forte, la réaction (1) n'est pas limitante et la vitesse du dégagement d'oxygène dépendra de la valeur de k_2 par rapport à k_1 . Si $k_2 < k_1$ (cas probable de la photosynthèse au sens classique du terme), la reformation de *A* dépendra de la vitesse de la réaction $C \rightarrow A$, c'est-à-dire qu'après un premier dégagement d'oxygène ou *jet*, mesurant la quantité de *A* (JOLIOT, 1961_a), il faudra attendre que *A* atteigne une concentration stationnaire pour que l'oxygène soit libéré avec une vitesse également stationnaire. Si au contraire $k_2 > k_1$ (cas probable de la réaction de HILL), la réaction limitante étant alors la réaction (2), on observera un dégagement d'oxygène s'effectuant dès le départ à une vitesse constante. C'est en particulier l'existence du jet en photosynthèse qui a permis d'élaborer le cycle proposé.

BLINKS et SKOW (1938) furent les premiers à mettre en évidence le jet d'oxygène avec des algues et des feuilles, mais ils ne l'interprétèrent pas comme partie intégrante de la photosynthèse. Par contre JOLIOT (1961_a et _b), en reprenant les mêmes observations, parvint à démontrer la parenté étroite entre le dégagement transitoire et le dégagement stationnaire d'oxygène au cours de la photosynthèse.

C'est à FRANCK (1945) que revient la primeur d'avoir constaté l'équivalent d'un jet avec des chloroplastes sans oxydant externe. Toutefois cet auteur conclut à une transformation photochimique d'un dérivé du CO_2 accumulé dans les chloroplastes *in situ*, avant le broyage des feuilles.

Il est intéressant de rappeler que la première observation d'un dégagement d'oxygène par des chloroplastes hors de la cellule date du XIX^e siècle. A cette époque en effet, ENGELMANN (1881), employant la méthode du chimiotactisme bacté-

rien, signala une très faible libération photochimique d'oxygène par un broyat de feuilles. Mais les travaux sur les propriétés des chloroplastes isolés ne connurent un véritable essor que depuis 25 ans, grâce à la découverte par HILL (1937) de la réaction qui porte maintenant son nom.

Si l'on reprend l'analyse cinétique donnée plus haut, il est évident que pour étudier le jet avec des chloroplastes isolés, il faut se replacer dans des conditions où $k_2 < k_1$. En fait, le plus simple est de supprimer la réaction (3), par exemple en supprimant Z.

Ce sont les résultats obtenus avec des chloroplastes isolés, en l'absence de réactif de HILL, qui font l'objet essentiel du présent rapport. Quelques expériences de réaction de HILL seront également mentionnées, suggérant que, même dans ce cas, il est possible de déceler une induction du dégagement d'oxygène.

Récemment, d'autres laboratoires se sont attaqués au même problème : c'est ainsi qu'ont pu être confirmées certaines des observations qui seront relatées ci-dessous (FORK, 1963) et que des phénomènes d'induction de la vitesse d'absorption de l'anhydride carbonique (VEJLBY, 1960) ou d'induction du rendement de fluorescence de la chlorophylle (THOMAS et coll., 1962) ont été signalés avec des chloroplastes isolés.

Afin d'éviter de surcharger ce mémoire de références bibliographiques, il n'est pas fait mention des nombreuses publications classiques en relation avec ce travail : on les retrouvera essentiellement dans la monographie exhaustive de RABINOWITCH.

Abréviations :

TMS	= solution tampon de tris-maléate 0,1 M contenant du saccharose 0,4 M ;
PMS	= phénazine méthosulfate (ou sulfate de N-méthyl phenazonium) ;
CMU	= 3-(p-chlorophényl)-1, 1-diméthylurée ;
NADP	= nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (= ex - TPN) ;
FeCy	= ferricyanure de potassium ;
DPIP	= 2,6-dichlorophénol indophénol.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. — PRÉPARATION DES CHLOROPLASTES ISOLÉS

1. Culture

Les chloroplastes sont extraits de feuilles de *Zea Mays* L. (Maïs hybride, variété I.N.R.A. 200). Les plantes sont cultivées dans des serres, suivant les méthodes courantes de l'aquiculture (cf. HOMES, ANSIAUX et VAN SCHOOR, 1953). L'éclairage est apporté par la lumière du jour et la température moyenne est d'environ + 23 °C, tandis que l'humidité ambiante se situe en moyenne autour de 65 % de la saturation.

Les graines, lavées et triées, sont mises à gonfler pendant 24 heures dans de l'eau distillée puis à germer en atmosphère saturée d'humidité sur un tamis pendant

4 jours. Les germinations les plus semblables sont alors transplantées dans un bac en matière plastique à double fond, la séparation étant assurée par une plaque perforée soutenant plusieurs centimètres de gravier de quartz inerte lavé. Les plantules sont repiquées à environ 4 cm de la surface du gravier et le bac rempli d'une solution nutritive jusqu'au niveau des racines. Le milieu nutritif (ajusté à pH 5,5) est composé suivant la formule I d'HOAGLAND-ARNON (voir HOMES, ANSIAUX et VAN SCHOOR, 1953) et additionné, pour les oligoéléments, des solutions A₁ et B₇ d'ARNON (1938). Le fer est fourni à l'état ferreux (1 " ₁₀₀ d'une solution à 0,5 % de Fe SO₄, 7 H₂O dans de l'acide tartrique à 0,4 %) ; l'apport en est renouvelé toutes les semaines.

Un barbotage permanent d'air assure l'aération des racines et l'homogénéité de la solution. Une fois par jour celle-ci est retirée du bac, puis rajoutée. Les prélèvements de feuilles sont effectués lorsque les plantes sont âgées d'environ un mois.

2. Extraction des chloroplastes

La méthode décrite dérive des techniques classiques utilisées par différents auteurs (ARNON, WHATLEY et ALLEN, 1956 ; AVRON, 1960). Les opérations sont effectuées en salle froide (+ 2 °C) et avec une centrifugeuse réfrigérée à 0 °C.

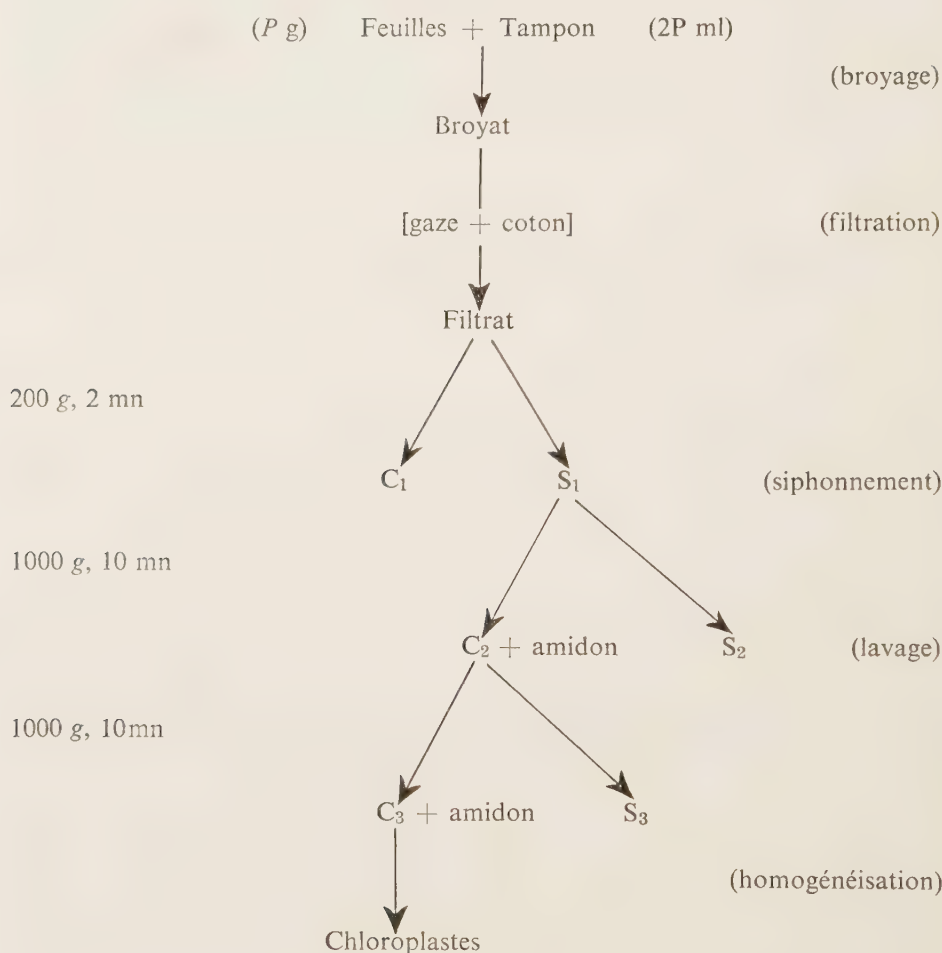
Les limbes détachés sont coupés en morceaux d'environ 2 cm de longueur, les parties nécrosées ou proches du chaume étant éliminées. Les morceaux foliaires pesant P g (généralement $P = 50$ à 100) sont placés dans le bol d'un mixer et additionnés d'un volume $= 2 P$ ml d'une solution tampon de tris-maléate 0,1 M contenant du saccharose 0,4 M et ajustée à pH 6,6 après filtration. Dans certains cas le phosphate remplace le tris-maléate. Après 15 s de broyage à vitesse réduite, on laisse reposer 30 s, puis on broie à nouveau pendant 15 s, mais à grande vitesse. L'élévation moyenne finale de température est d'environ 7 °C.

Le broyat est filtré, ainsi que les jus de rinçage, sur de la gaze et du coton. Après une centrifugation du filtrat à 200 g pendant 2 mn, le surnageant est recueilli par aspiration sous vide. Pour cela, on plonge dans le liquide, sans toucher le culot, une pipette à bout recourbé vers le haut et dont l'autre extrémité est reliée à un tube fermé par une plaque de verre fritté « Pyrex » n° 2 ou 3. Dans ces conditions, on évite l'entraînement des débris cellulaires du culot.

La fraction récupérée est alors centrifugée pendant 10 mn à 1 000 g et le surnageant est rejeté. Le culot de chloroplastes est souvent accompagné d'amidon (sous forme d'une collerette en cas de centrifugation avec position oblique des pots). Cet anneau d'amidon représente la fraction lourde du culot et risque de contenir encore quelques débris cellulaires ; aussi l'élimine-t-on à l'aide d'un pinceau et par rinçage avec du tampon. Les chloroplastes sont ensuite resuspendus dans environ P ml de tampon et recentrifugés pendant 10 mn à 1 000 g. Le nouveau surnageant est rejeté et le nouvel anneau d'amidon éliminé comme précédemment.

Les chloroplastes ainsi lavés sont resuspendus dans environ $\frac{P}{2}$ ml de tampon et homogénéisés dans un tube « Potter » à piston de « teflon ». La suspension ainsi obtenue est conservée à l'obscurité et au froid (+ 2 °C).

Les opérations sont résumées dans le diagramme suivant :



(C = culot ; S = surnageant).

La préparation finale est observée au microscope : elle est composée essentiellement de chloroplastes entiers (5 à 6 μ sur 4 à 4,5 μ), de quelques fragments de chloroplastes et souvent d'un peu d'amidon ; de plus on constate parfois quelques rares débris mal définis.

Des vérifications faites au microscope électronique n'ont pas montré de contamination appréciable des préparations. Il est intéressant de noter que si, apparemment, l'intégrité globale du chloroplaste est respectée, il n'en est pas de même pour sa membrane périphérique qui a disparu.

3. Dosage des pigments

Les pigments totaux sont dosés dans l'acétone aqueuse, selon les méthodes courantes (MACKINNEY, 1941 ; ARNON, 1949 ; BRUINSMA, 1961). A 0,1 ml de chloroplastes sont ajoutés 1,9 ml d'eau et 8 ml d'acétone. Après filtration de la solution (sur papier « Durieux » n° 111, bande bleue), les pigments sont dosés au spectrophotomètre par mesure de la densité optique (DO) à 645, 652 et 663 m μ .

A partir des données de MACKINNEY on tire les relations suivantes (en mg pigments/ml solution acétonique à 80 % dans l'eau) :

$$\text{chlorophylle } a = 0,0127 \text{ DO}_{663} - 0,00269 \text{ DO}_{645} = a ;$$

$$\text{chlorophylle } b = 0,0229 \text{ DO}_{645} - 0,00468 \text{ DO}_{663} = b ;$$

$$\text{caroténoïdes} = \frac{\text{DO}_{460} - (3,19 \cdot a + 130,3 \cdot b)}{200} \quad (\text{essentiellement : } \beta\text{-carotène} + \text{lutéine}).$$

$$\text{A } 652 \text{ m}\mu, \text{ on a : chlorophylle totale} = \frac{\text{DO}_{652}}{\gamma} ; \gamma = 34,5 \text{ (ARNON) ou } 36 \text{ (BRUINSMA)}.$$

Toutes ces valeurs sont évidemment à multiplier par le coefficient de dilution des chloroplastes dans l'acétone aqueuse pour avoir la concentration des pigments dans la suspension-mère.

Si l'on prend comme base les concentrations calculées d'après les formules de MACKINNEY pour les chlorophylles $a + b$ (à 645 et 663 m μ) et qu'on les compare à celles obtenues (à 652 m μ) pour la chlorophylle totale à partir des formules d'ARNON et de BRUINSMA, on constate des écarts importants entre les différentes valeurs. Il a été trouvé empiriquement que, pour égaliser les concentrations calculées à 645 et 663 m μ avec celles découlant des mesures à 652 m μ , il faut prendre un coefficient $\gamma = 38,4 \pm 2,6$ (moyenne de 10 extractions sur des lots différents, dans les conditions décrites ci-dessus) et non 34,5 ou 36. On voit donc que l'extrait acétonique brut contient des impuretés dont certaines modifient les coefficients d'extinction aux longueurs d'onde de mesure (cela est probablement dû surtout à de la phéophytine a). Il apparaît que ces impuretés doivent être en concentrations variables suivant les extractions étant donné l'imprécision de $\pm 2,6$ (soit environ 7 %) obtenue sur 38,4.

Pratiquement, pour exprimer la concentration des chloroplastes, c'est le coefficient de BRUINSMA qui a été utilisé, car il ne peut être attribué de signification précise à celui trouvé ici expérimentalement.

Les suspensions finales sont amenées, par dilution avec le tampon, à la concentration désirée (généralement 200 ou 300 μg chlorophylle/ml chloroplastes).

On a aussi calculé les rapports suivants :

$$\frac{\text{chlorophylle } a}{\text{chlorophylle } b} = 2,18 \pm 0,34 \quad \text{et} \quad \frac{\text{caroténoïdes}}{\text{chlorophylles}} = 0,087 \pm 0,039.$$

4. Rendement brut d'extraction (ρ)

$$\rho = \frac{\overset{m}{\text{mg chlorophylle dans la préparation totale extraite}}}{P \text{ g matériel frais broyé}} = \frac{\overset{m}{\text{mg chlorophylle/g de matière fraîche}}}{P}$$

ρ varie, suivant les saisons, de 60 à 200. En général, $\rho \approx 130$.

II. — PRÉPARATION DES TAMPONS, DES RÉACTIFS ET DES GAZ

1. Tampons à différents pH

Les tampons à différents pH sont obtenus en faisant varier la proportion de soude par rapport à celle du tris-maléate, la concentration globale restant constante.

2. Réactifs

— La *catalase* cristallisée de foie de bœuf est dissoute dans le tampon.

— Le *cyanure* de potassium est dissous dans la soude 10^{-3} N.

— La 3-(p-chlorophényl)-1,1-diméthylurée ou *CMU*, l'*o*-phénanthroline, le phényluréthane et le chlorhydrate d'*hydroxylamine* sont dissous dans l'éthanol à 10 %.

— Le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate ou *NADP*, le phénazine méthosulfate ou *PMS*, le ferricyanure de potassium ou *FeCy* et le 2,6-dichlorophénol indophénol ou *DPIP* sont dissous dans l'eau.

Toutes les solutions sont amenées à une concentration dix fois supérieure à celle désirée dans le mélange réactionnel.

3. Gaz

Les deux gaz principalement utilisés sont l'air atmosphérique ($\sim 21\%$ O_2) et l'azote « R » (théoriquement : à 20 p.p.m. d'impuretés : pratiquement : environ 1 ‰ O_2).

Les expériences sont généralement menées en atmosphère d'air ambiant.

III. — DISPOSITIF DE MESURE DES ÉCHANGES D'OXYGÈNE

(L'objet de ce paragraphe a bénéficié de nombreuses indications de Monsieur LAVOREL. L'électrode de mesure décrite dérive d'un modèle qu'il a construit au laboratoire).

1. Dosage ampérométrique de l'oxygène dissous en milieu liquide

C'est la méthode qui a été adoptée, car elle permet une sensibilité et une rapidité de réponse (à des variations de concentration d'oxygène) bien supérieures à celles données par la méthode manométrique de WARBURG.

a. Principe

L'essentiel des données de base et de la bibliographie ainsi que nombre d'indications techniques figurent dans l'ouvrage de KOLTHOFF et LINGANE (1952). Brièvement, le principe de la méthode consiste en la mesure du courant électrique résultant de la réaction électrochimique entre un corps électroactif dissous et une électrode polarisée (dite électrode de mesure).

Si l'on plonge dans un milieu liquide, contenant une substance électroactive dissoute, un couple d'électrodes dont l'une peut être portée à un potentiel v connu par rapport à l'autre électrode, impolarisable, on constate qu'en faisant varier ce potentiel et en mesurant le courant i du circuit, on obtient une courbe $i = f(v)$ sigmoïde (voir fig. 1). Cette courbe est limitée en haut et en bas par les *courants de diffusions* anodique et cathodique de la substance. L'abscisse du point d'inflexion (*potentiel de demi-vague*) est égale au potentiel normal (E'_0) du corps dissous. C'est une analyse par *polarographie*, découverte par HEYROVSKY vers 1920. On constate également que si l'on fait varier la concentration du corps électroactif, on obtient une relation simple entre i et la concentration c : $i = kc$ (où k est une constante). Cette loi fondamentale a permis l'analyse polarographique quantitative par *ampérométrie* des corps électroactifs dissous. Pratiquement, pour doser une substance on se place de préférence au *potentiel de demi-palier* du plateau supérieur de la courbe en S. Là, en effet, une variation de potentiel ne se traduit que par une très faible variation de courant, ce qui permet une plus grande sécurité des mesures.

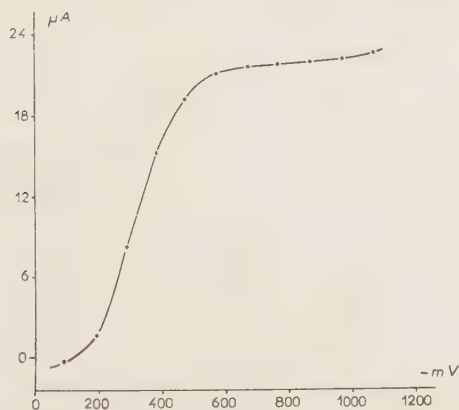


FIG. 1. — Polarogramme de l'oxygène, obtenu avec l'électrode à membrane.

Concentration d'oxygène dans l'eau, saturée d'air atmosphérique : $2,73 \cdot 10^{-4}$ M (22 °C).

On utilise fréquemment une électrode à goutte de mercure, mais elle a l'inconvénient de donner des mesures discontinues. Aussi emploie-t-on également des couples formés d'un métal généralement noble comme le platine et d'une électrode impolarisable comme celle au calomel ou à l'argent-chlorure d'argent, par exemple.

Dans certains cas, il y a intérêt à isoler de la solution l'électrode de mesure par une barrière sélective empêchant l'interférence, au niveau de l'électrode, d'autres corps électroactifs avec celui que l'on désire doser. Avec les gaz dissous comme

l'oxygène, cette barrière peut être une membrane en polyéthylène ou en « teflon », perméable aux gaz mais pratiquement pas aux ions ou aux autres molécules. Dans le cas de l'utilisation d'une membrane, d'un côté se trouveront les électrodes et l'électrolyte, de l'autre la solution contenant le corps à doser.

Pour le dosage de l'oxygène, plusieurs modèles d'*électrode à membrane* ont été proposés : le plus courant est dû à CLARK (1953) et des modifications intéressantes ont été apportées par d'autres auteurs (CARRITT et KANWISHER, 1959).

Dans plusieurs cas, l'utilisation d'une électrode à membrane est indispensable : addition d'oxydants pour la réaction de HILL, présence de cyanure dans la solution (avec ce dernier et une électrode de référence d'argent il y aurait, sans membrane, formation de complexes suivant la réaction : $\text{Ag}^+ + 2 \text{CN}^- \longrightarrow [\text{Ag}(\text{CN})_2]^-$).

L'interposition d'une membrane entraîne une diminution de la vitesse de diffusion de l'oxygène vers l'électrode, ce qui a pour conséquence une augmentation du temps de réponse à des variations de concentration d'oxygène.

b. Réactions aux électrodes

Si l'électrolyte est une solution aqueuse de chlorure de potassium on a :



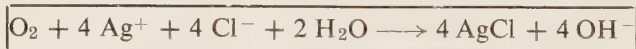
Au niveau de l'électrode d'argent il y a libération d'ions Ag^+ et formation de chlorure d'argent (peu soluble) :



Au niveau de l'électrode de platine il y a réduction de l'oxygène :



En additionnant les différentes réactions, on obtient le bilan global :



Il y a donc alcalinisation du milieu et consommation d'Ag, de Cl^- et d'eau (ces dernières conséquences sont pratiquement négligeables).

c. Equations électrochimiques simplifiées

On examinera ici le cas des mesures de concentrations avec une électrode à membrane.

Il existe une relation entre le courant électrique mesuré et la vitesse de diffusion de l'oxygène.

Soit :

i = courant électrique ;

q = quantité d'électricité ;

t	= temps ;
n	= valence ;
R	= constante molaire des gaz parfaits ;
F	= faraday ;
T	= température absolue ;
m	= nombre de molécules du corps dissous ;
c	= concentration molaire du corps dissous dans l'électrolyte ;
V	= volume de l'électrolyte, entre l'électrode et la membrane ;
A	= aire de la section obtenue par un plan parallèle à la surface de l'électrode de mesure, à l'intérieur de l'électrolyte ;
x	= distance considérée dans l'électrolyte, entre la membrane et l'électrode, normalement à la section A ;
ΔF^0	= variation d'énergie libre standard d'activation du passage d'un point à un autre d'une molécule du corps dissous ;
D	= coefficient de diffusion (considéré constant) ;
B	= constante complexe.

La figure 2 illustre le cas étudié. On considère une épaisseur x d'électrolyte (El) entre l'électrode (Pt) et la membrane (Mb). Au niveau de la membrane la concentration d'oxygène c est maximale. A celui de l'électrode de platine, comme il y a consommation électrochimique d'oxygène, $c = 0$. La surface de Pt, tournée vers la membrane, a donc été choisie pour origine des mesures de c et x .

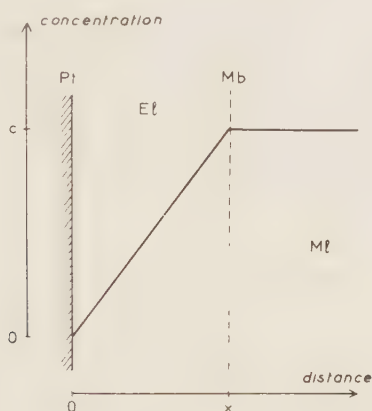


FIG. 2. — Diagramme schématisant la variation de concentration d'oxygène, du milieu extérieur vers l'électrode de platine.

Pt : électrode de platine ;
 El : électrolyte ;
 Mb : membrane ;
 Ml : milieu extérieur.

La concentration d'oxygène est constante dans le milieu extérieur (= c) puis diminue dans l'électrolyte à partir de la membrane (distance = x) pour devenir nulle à l'électrode de platine.

On a
$$i = \frac{dq}{dt} \quad \text{et} \quad dq = nF dm, \text{ soit}$$

$$i = \frac{nF dm}{dt} .$$
(loi de FARADAY)

On a également

$$\frac{dm}{dt} = - DA \frac{\partial c}{\partial x} \quad (\text{première loi de FICK}),$$

où $\frac{dm}{dt}$ est la vitesse de diffusion du corps dissous et $\frac{\partial c}{\partial x}$ son gradient de concentration dans l'électrolyte. On obtient donc

$$i = - nFDA \frac{\partial c}{\partial x} .$$

On suppose constant le gradient, soit $\frac{\partial c}{\partial x} = \alpha$; de $dc = \frac{\partial c}{\partial x} dx$, on tire alors $c = \alpha x + C^{te}$ et comme $c = 0$ pour $x = 0$, $C^{te} = 0$ et $\frac{\partial c}{\partial x} = \alpha = \frac{c}{x}$. Il en résulte

$$i = - \frac{nFDA}{x} c ; \text{ soit, si } k = - \frac{nFDA}{x} , \quad \underline{i = kc}$$

(relation déjà donnée plus haut).

La constante k est calculée expérimentalement en mesurant le courant i_0 au temps 0, car on peut connaître la concentration initiale c_0 du corps dissous.

La valeur de c représente la concentration d'oxygène à la face interne de la membrane. A la face externe, cette concentration est en fait bien supérieure à c , car il existe un gradient de concentration important à l'intérieur de la membrane. De sorte que la constante de proportionnalité mesurée tient compte en réalité de la diffusion à travers la membrane.

Par ailleurs $dc = \frac{dm}{V}$; d'où, en remplaçant dm dans la relation $i = \frac{nF dm}{dt}$,

on a
$$i = nFV \frac{dc}{dt} .$$

Comme $i = - \frac{nFDA}{x} c$,

on a
$$- \frac{nFDA}{x} c = nFV \frac{dc}{dt} \quad \text{et par conséquent} \quad \frac{dc}{dt} = - \frac{DA}{Vx} c ;$$

soit, si $k' = \frac{DA}{Vx}$, $\frac{dc}{dt} = - k' c$. Donc $\frac{dc}{c} = - k' dt$ et $\ln c = - k' t + C^{te}$.

A $t = 0$, $c = c_0$ et $C^{te} = \ln c_0$. Finalement $\underline{c = c_0 e^{-k't}}$ ou encore $i = i_0 e^{-k't}$.

La consommation de l'oxygène par l'électrode (*autoconsommation*) suit une loi de décroissance exponentielle, ce qui a été vérifié ici expérimentalement (dans quelques cas, toutefois, il n'en est pas rigoureusement ainsi, en particulier après un temps long).

Enfin on peut écrire la relation simplifiée suivante entre le coefficient de diffusion et la température : $D = B e^{-\frac{\Delta F^0}{RT}}$.

On voit donc qu'il y a une influence de la température sur l'équation finale :

$$i = - \frac{nFAB}{x} e^{-\frac{\Delta F^0}{RT}} c$$

En fait, il pourrait y avoir une autre influence de la température sur la courbe polarographique (par modification du potentiel d'oxydoréduction). Mais pratiquement au potentiel de demi-palier cette influence n'apparaît pas et l'on n'a observé ici, expérimentalement, qu'une relation exponentielle entre le courant mesuré et la température.

L'importance de la diffusion découle de ces quelques considérations théoriques. Il faut que la concentration d'oxygène au niveau le plus proche de l'électrode polarisée soit identique à celle du milieu en général. Il y a donc intérêt à plaquer le plus possible l'électrode de platine contre la membrane, c'est-à-dire à diminuer au maximum l'épaisseur du film d'électrolyte. Il faut aussi maintenir, de l'autre côté de la membrane, une concentration égale dans toutes les directions, ce qui suppose une excellente agitation de la solution. De plus, l'influence du facteur thermique sur le coefficient de diffusion implique une constance rigoureuse de la température. Il est évident qu'avec une suspension de particules biologiques dans lesquelles se déroulent diverses réactions, des exigences d'homogénéisation et de thermorégulation sont également à considérer. Ces différents facteurs ont été présents à l'esprit lors de la réalisation du montage pratique décrit ci-dessous.

2. Montage expérimental

a. Appareillage

Le schéma en est donné dans la figure 3.

ELECTRODE

(Le collage des différentes pièces est assuré grâce à une résine polymérisée « araldite »).

Le support de l'électrode de platine, négative, est constitué par un piston (h) formé d'un manchon de verre collé à une tube de verre. A la base du piston est fixé un disque de platine (e) dont le centre est creusé puis obturé avec de l'araldite (f) qui sert également à recouvrir la tranche du disque. A l'intérieur du tube une goutte de mercure (g) permet le contact avec un fil (j). L'électrode de référence est un fil d'argent (i) parallèle au piston. Les contacts électriques sont assurés par une borne coaxiale miniature (m) reliée à la source de polarisation par un câble coaxial dont le blindage est connecté au fil d'argent.

Le tube porte-membrane est obtenu en tendant une membrane (a) de polyéthylène (environ $25\ \mu$ d'épaisseur) sur un tube de verre (d) et en la maintenant à l'aide d'un manchon de verre (b) qui est ensuite collé. A l'intérieur du cylindre ainsi constitué, la solution de KCl 0,5 M (c) sert d'électrolyte.

Le bloc d'électrodes est alors introduit dans le tube porte-membrane et l'ensemble est rendu solidaire à l'aide d'un manchon (l) ajusté au diamètre extérieur du tube (d).

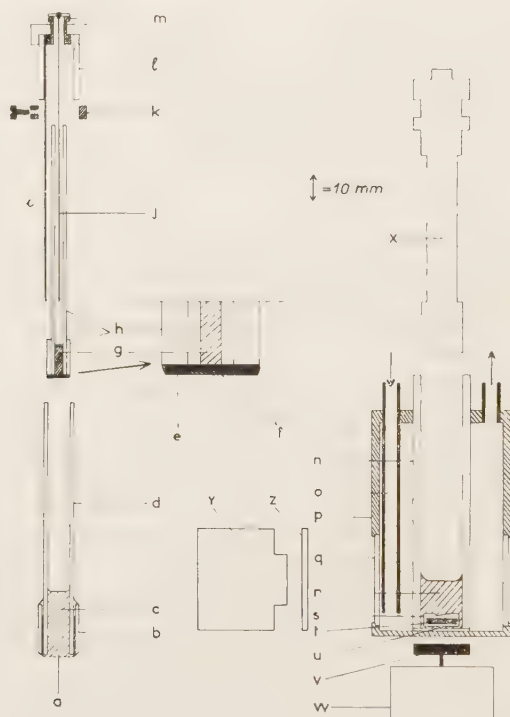


FIG. 3. — Schéma du dispositif de dosage ampérométrique de l'oxygène.

A gauche : Vue éclatée des différentes pièces et vue grossie de l'électrode de platine.
A droite : en haut, silhouette de l'électrode ; en bas, coupe de la cuve de mesure.

CUVE DE MESURE

La cuve de mesure est formée d'une enveloppe extérieure (p) en matière plastique noire comportant deux fenêtres de verre (q) diamétralement opposées et parallèles. Deux tubes (o) permettent une circulation d'eau à température constante ($\uparrow$). Au centre de la cuve est fixé un tube cylindrique en verre (n) dont le diamètre intérieur est égal au diamètre extérieur du manchon (b). Au fond de ce tube repose un petit disque de « plexiglas » (s) contenant un aimant (t) et portant des encoches sur sa face supérieure ; au centre de la face inférieure du disque est logée une petite bille de verre (u). Cette *toupie* est entraînée par un aimant (v) tournant à 3 000 tr/mn grâce à un moteur synchrone (w). La suspension de chloroplastes (r) est contenue à l'intérieur du tube central (n) et l'électrode (x) peut être ensuite introduite jusqu'à une hauteur déterminée par une bague coulissante (k). Le niveau du liquide s'élève alors au dessus du manchon (b) et la cellule de mesure, soustraite ainsi à l'atmosphère extérieure, sera délimitée par la base et les parois du tube ainsi que par la membrane (a).

ECLAIREMENT

L'éclairement provient d'une (deux, éventuellement) lampe de microscope (y) située face à la fenêtre de la cuve. Il est possible d'interposer des filtres (z) perpendiculairement au faisceau lumineux. L'illumination et la mise à l'obscurité sont réalisées à l'aide d'un obturateur « Compur ». Les éclaircissements sont mesurés avec un bolomètre, les spectres d'absorption des filtres éventuellement utilisés étant de plus déterminés spectrophotométriquement.

Avec une ampoule de 12 V, 5 A et après interposition d'un filtre interférentiel anticalorique, on peut obtenir un spot qui correspond sensiblement à la section de la cellule de mesure et qui fournit un éclaircissement maximal moyen, dans le plan médian de la cuve centrale, d'environ $4 \cdot 10^5 \text{ ergs} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ (en l'absence de chloroplastes et compte tenu de l'absorption par le verre et l'eau).

Sauf dans les expériences portant sur l'influence de l'intensité de la lumière, l'éclaircissement utilisé correspond au maximum réalisable. Enfin une bonne et rapide agitation de la suspension permet un éclaircissement statistiquement homogène.

CIRCUIT ÉLECTRIQUE

Le circuit électrique est schématisé dans la figure 4.

La source de polarisation (P) est constituée par une pile au mercure « Mallory » de 1,35 V débitant dans un potentiomètre de 13 500 Ω . Une partie déterminée (V) de la tension sert à polariser l'électrode (E). Le courant est mesuré grâce à un galvanomètre enregistreur (G) de pseudopériode = 2 s et de résistance critique $R_c = 20 \text{ k}\Omega$. On peut le shunter éventuellement par une série de résistances (R_s) permettant de prendre 1/1 à 1/2 000 du courant total (position S) ou l'envoyer directement dans le circuit (position D). Lorsqu'une forte sensibilité entraîne la sortie du spot galvanométrique hors d'échelle, un renvoi (R) permet de le ramener à la position voulue. Ce renvoi de spot est constitué par une autre pile au mercure de 1,35 V débitant dans un potentiomètre de 10 k Ω . L'amplitude maximale du renvoi est déterminée à l'aide d'un rhéostat (A) de 0,5 M Ω maximal et dont le rôle est également d'éviter un shunt secondaire du galvanomètre.

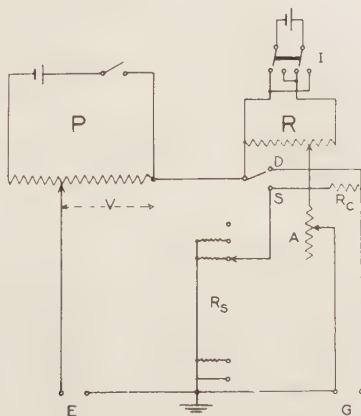


FIG. 4. — Circuit électrique du dispositif d'ampérométrie.

- P : circuit de polarisation (V = tension appliquée à l'électrode de platine) ;
 R : circuit du renvoi de spot (avec A = rhéostat d'amplitude et I = inverseur) ;
 R_s : résistances du shunt (avec R_c = résistance extérieure critique du galvanomètre) ;
 E : électrode ; G = galvanomètre enregistreur.
 Position D : circuit direct vers G ; position S : circuit shunté.

La durée d'utilisation des piles est déterminée par leur « capacité » et la résistance des circuits.

Les valeurs employées sont choisies de manière à éviter toute chute de tension appréciable dans le circuit de l'électrode.

b. Caractéristiques du dispositif expérimental

CHOIX DE LA TENSION DE POLARISATION

La figure 1 donne l'aspect d'un polarogramme obtenu avec l'électrode ainsi constituée. On note l'aspect sigmoïde de la courbe, signalé plus haut. Le potentiel de demi-palier est situé vers -800 mV. En général, en ampérométrie de l'oxygène avec une électrode de platine nue, on polarise à -700 mV ou même -600 mV. C'est pourquoi le potentiel de travail souvent utilisé ici a été de -700 mV (il ne semble pas d'ailleurs que ce point revête une grande importance).

En fait, la différence de forme des polarogrammes d'oxygène obtenus avec une électrode nue et une électrode à membrane pourrait être due à une différence de pH (cf. KOLTHOFF et LINGANE, 1952, fig. XIX-3, p. 405), même avec un électrolyte théoriquement neutre. Dans un milieu confiné comme l'est celui de l'électrode à membrane, le pH est probablement, à la longue, plus élevé qu'avec une électrode nue dont l'électrolyte est constamment renouvelé (cf. paragr. III - 1 b). Une autre explication possible de cette différence serait l'existence d'une résistance élevée de l'électrolyte, mais un calcul et une vérification parallèle effectuée dans ce laboratoire, semblent rejeter cette hypothèse. En effet, la résistance de la colonne d'électrolyte entre le piston et le tube a été calculée égale à $1\,000\ \Omega$ au maximum (et celle du film d'électrolyte entre le platine et la membrane n'excède probablement pas $5\,000\ \Omega$). Par contre la résistance apparente de l'électrode (obtenue en divisant la tension de polarisation, par le courant mesuré) vaut environ $60\text{ k}\Omega$, pour une surface de l'anneau de platine d'environ 35 mm^2 (celle du fil d'argent a été calculée égale à quelque 70 mm^2).

Au cours d'une même série d'expériences, les valeurs d'étalonnage ne diffèrent pas de plus de 2 %. En l'absence à peu près totale d'oxygène, le courant résiduel est égal à environ $1/700$ du courant correspondant à celui obtenu avec une solution saturée d'air à 21 % d'oxygène.

La stabilité du circuit électrique est d'environ $1/5\,000$ du courant total.

PRÉCAUTIONS A PRENDRE

L'agitation doit être très régulière et efficace. Cela explique le choix d'un moteur synchrone, la fixation d'une bille sous le disque pour diminuer les frottements et la présence d'encoches pour mieux brasser le milieu. Il faut aussi parfaitement équilibrer la toupie pour éviter des fluctuations d'agitation. Toutefois cette importante agitation provoque un mouvement tourbillonnaire central qui arrive probablement à tirer le milieu de la membrane vers le bas. Cela a pour conséquence une variation de l'épaisseur de l'électrolyte (encore plus sensible si le piston n'est pas bien plaqué contre la membrane) et donc des irrégularités du courant enregistré. C'est pour éviter cet inconvénient que l'électrode de platine a été choisie de forme annulaire, d'autant plus que l'agitation étant plus efficace et plus régulière aux bords de la cuve, on gagne doublement sur la qualité des enregistrements.

Une rupture de la membrane se traduit par de brusques variations du courant. Elle peut se déceler également par la formation d'un « louche » blanc de chlorure d'argent, au niveau de la lésion, si l'on plonge l'électrode à membrane dans une solution de nitrate d'argent.

Il faut éviter d'éclairer violemment les électrodes. L'illumination directe de l'électrode de platine donne un effet (photothermique ?) se traduisant par une augmentation du courant. Par contre, l'éclairement de l'électrode d'argent provoque un effet (photoélectrique ?) entraînant une diminution du courant.

INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE

La relation entre la valeur du facteur thermique et la réponse de l'électrode a été étudiée. Les mesures ont été effectuées à 5, 15, 25, 35 et 45 °C et les résultats sont donnés dans la figure 5.

Pour chaque température on calcule la concentration d'oxygène dissous, à partir de l'atmosphère utilisée comme phase gazeuse, suivant la formule :

$$c = \frac{q \cdot p}{10 Z}$$

où : c = concentration molaire dans l'eau du gaz pur dissous ;

q = masse en g de gaz pur dissous dans 100 g d'eau pour une pression totale de 760 mm de mercure (pression partielle du gaz plus tension de vapeur d'eau à la température considérée) ;

p = proportion du gaz considéré dans l'atmosphère utilisée, en % ;

Z = masse moléculaire du gaz dissous.

Les valeurs de q et de p sont données dans les tables (cf. HODGMAN, WEAST et SELBY, 1961-1962). A 15 °C, température courante des expériences, et pour l'air, $c = 3,16 \cdot 10^{-4}$ M.

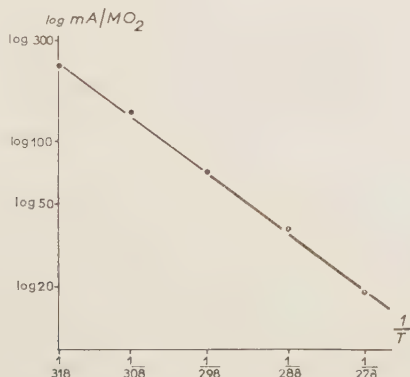


FIG. 5. — Effet de la température sur la sensibilité de l'électrode à membrane.

En ordonnée, échelle logarithmique ; en abscisse, échelle linéaire des inverses des températures absolues correspondant à 5, 15, 25, 35 et 45 °C.

On ramène les courants mesurés à une mole d'oxygène et l'on porte le logarithme de ces valeurs en fonction de l'inverse de la température absolue. On obtient une droite dont la pente donne la variation d'énergie libre standard de la diffusion de l'oxygène dans le milieu, c'est-à-dire pratiquement à travers la membrane

$$\left(\frac{i}{c} = - \frac{nFAB}{x} e^{-\frac{\Delta F^0}{RT}} \right).$$

On a trouvé $\Delta F^0 \approx + 11$ kcal et un Q_{10} d'environ 2,8. D'autres données, calculées à partir des courbes d'une récente publication (RAYMENT, 1962), ont permis de constater une similitude très satisfaisante des résultats. Ces valeurs thermodynamiques élevées soulignent toute l'importance d'une parfaite thermorégulation du milieu.

RÉSULTATS

Les premiers résultats ont été exposés dans quelques articles préliminaires (DE KOUCHKOVSKY, 1961 et 1962) ou sont en cours de publication (DE KOUCHKOVSKY, 1963).

I. — MISE EN ÉVIDENCE DE L'INDUCTION

1. Enregistrements

La figure 6 reproduit un enregistrement obtenu avec des chloroplastes dans les conditions normalisées d'expérimentation (chloroplastes isolés entiers, en suspension dans du tampon tris-maléate 0,1 M + saccharose 0,4 M à pH 6,6 sans réactif de HILL, amenés à une concentration exprimée en chlorophylle de 300 μ g/ml, équilibrés à l'obscurité pendant 5 mn avec l'air à 15 °C, éclairés en forte lumière blanche).

À l'obscurité, on constate une absorption d'oxygène (a — b), dont une partie est due à l'autoconsommation de l'oxygène dissous par l'électrode. À l'illumination, on note un dégagement d'oxygène (b — c), débutant avec un léger retard (environ 2 s) à cause du temps de latence apporté par le système de mesure et arrivant rapidement (environ 10 s) à un maximum (c). Ensuite on remarque, au cours de la phase (c — d), une absorption d'oxygène importante et prolongée. Lorsqu'on rétablit l'obscurité (d), il se produit une augmentation temporaire de la vitesse d'absorption d'oxygène qui diminue ensuite pour tendre asymptotiquement vers une valeur constante. Si l'on réillumine la suspension, on observe un nouveau dégagement d'oxygène, mais plus faible que la première fois.

La figure 7 montre un enregistrement de même type mais effectué avec une électrode à double membrane analogue à celle de FORK (1963), elle-même inspirée du modèle de HAXO et BLINKS (1950), et construite dans le laboratoire par GINGRAS. Cette électrode permet de mesurer directement les vitesses des échanges d'oxygène (c'est-à-dire que l'on obtient la dérivée d'un enregistrement de concentrations). On voit nettement les phases décrites ci-dessus (mêmes notations que pour la figure 6).

2. Interprétation

Il importait, avant de poursuivre ces recherches, de confronter les premiers résultats avec l'hypothèse de travail émise au départ.

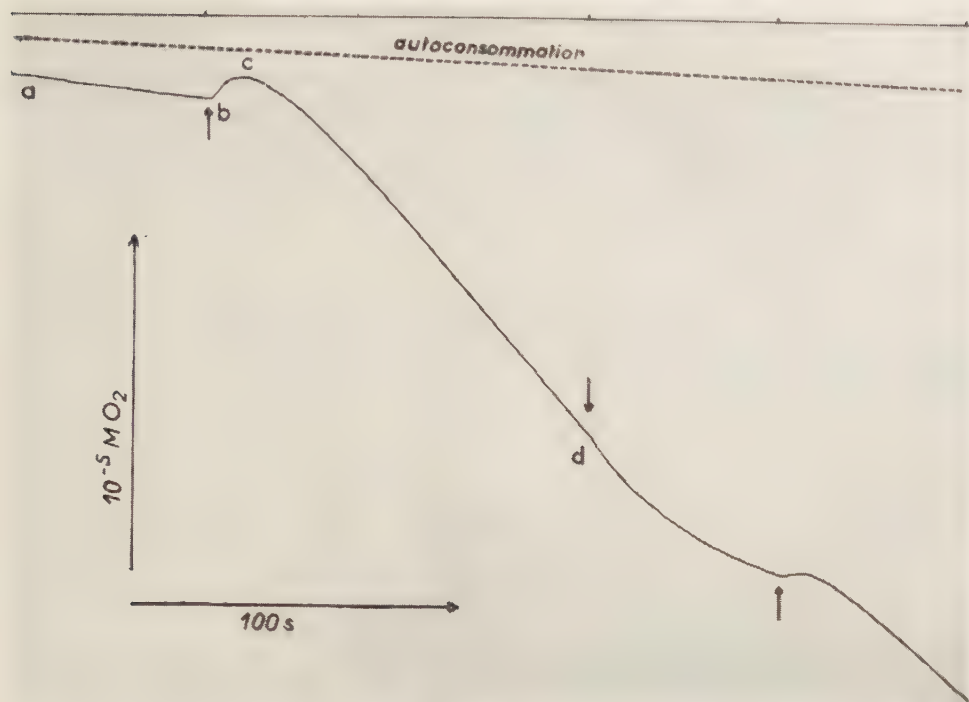


FIG. 6. — Reproduction photographique d'un enregistrement de mesure des concentrations d'oxygène.

Chloroplastes : 300 μg chlorophylle/ml dans TMS pH 6,6.

Pas de réactif de HILL. Air. 15 °C.

↑ : lumière ;

↓ : obscurité.

Autoconsommation : dérive négative constante, mesurée en remplaçant les chloroplastes par du tampon.

a, b, c, d : voir dans le texte.

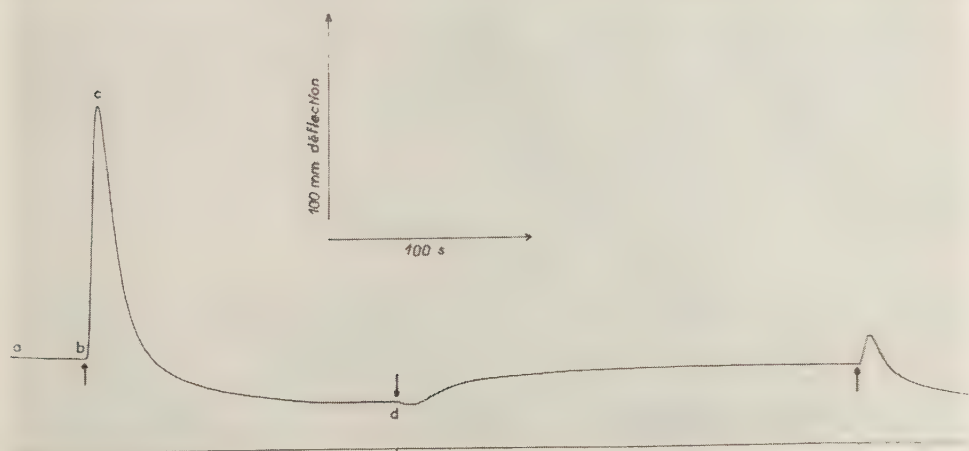


FIG. 7. — Reproduction photographique d'un enregistrement de mesure des vitesses d'échange d'oxygène.

Chloroplastes : 900 μg chlorophylle/ml dans TMS pH 6,6.

Pas de réactif de HILL. Azote. 15 °C.

↑ : lumière ;

↓ : obscurité.

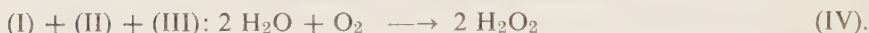
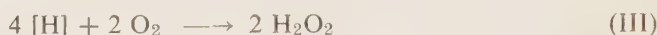
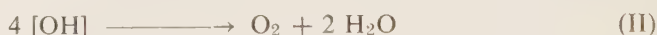
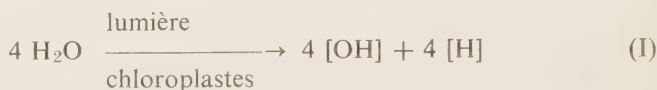
a, b, c, d : voir dans le texte.

— La phase (a — b). correspond à une absorption endogène d'oxygène des chloroplastes (*endoabsorption*), mal définie dans sa nature, mais notée par différents auteurs (cf. RABINOWITCH, pages 1606 à 1608). Toutefois les principaux systèmes d'oxydo-réduction des chaînes respiratoires classiques sont probablement absents de ces organites (cf. DE KOUCHKOVSKY, 1959 et 1961).

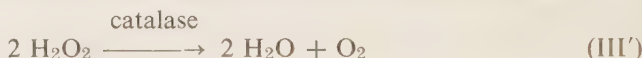
— Le dégagement transitoire (b — c) vérifie l'hypothèse de base : il correspond en effet au *jet* postulé.

— La *photoabsorption* (c — d) par contre, n'était pas mentionnée dans les prévisions. Elle peut, en première approximation, être attribuée au déroulement d'une réaction de MEHLER (1951_a et _b) où l'oxygène externe, dissous dans la solution, joue le rôle d'oxydant du photoproduit réducteur.

On a en effet :



En présence de catalase, il y aurait dismutation de l'eau oxygénée formée :



et le bilan des échanges d'oxygène serait alors nul.

En fait, les chloroplastes lavés sont pauvres en catalase (JAGENDORF et WILDMAN, 1954 et ci-dessous, paragraphe IV-1) ; de plus, il peut y avoir une photo-inhibition de cette enzyme (LAVOREL, 1956). Dans ces conditions le bilan global est représenté plutôt par la réaction (IV) et il y a donc absorption d'oxygène.

— L'augmentation temporaire de la vitesse d'absorption d'oxygène lors de la remise à l'obscurité (d) ou *extraabsorption* peut s'expliquer dans le cadre de l'hypothèse précédente. Si l'on admet que la vitesse de la réaction (II) est beaucoup plus grande que celle de la réaction (III), la première s'arrêterait presque instantanément à l'obscurité alors qu'il pourrait subsister une certaine réserve du photoproduit réducteur [H]. Celui-ci s'oxyderait au contact de l'oxygène externe, ce qui se traduira par une absorption encore plus forte qu'à la lumière, car elle ne serait plus partiellement compensée par une libération d'oxygène. Puis, le stock de [H] s'épuisant, on tendra vers une vitesse égale à celle de la phase (a — b).

— La réapparition du jet (*récupération*) s'interprète en supposant que l'oxygène libéré proviendrait d'un *complexe* en concentration limitée dont la reformation pourrait avoir lieu non seulement à la lumière, mais également à l'obscurité.

3. Modes de calculs graphiques

La figure 8 est la représentation schématisée d'un enregistrement-type où l'on porte en abscisse le temps et en ordonnée la concentration d'oxygène. La ligne en

tirets, à gauche, représente une fraction de la dérive que l'on aurait obtenue si la suspension était remplacée par le tampon seul. (L'interprétation des parties hachurées p et q sera donnée plus loin).

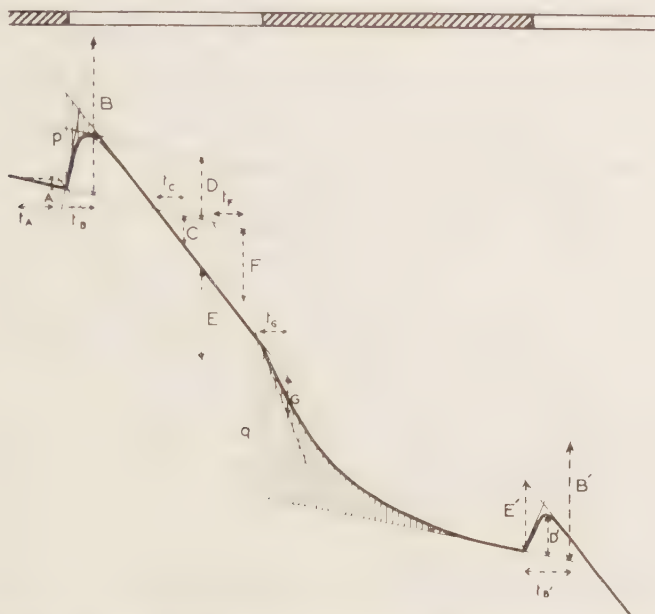


FIG. 8. — Représentation schématisée des courbes-types obtenues avec l'électrode de mesure des concentrations d'oxygène.

: lumière :

||||||| : obscurité.

En abscisse, temps ; en ordonnée, concentration d'oxygène.

Signification des symboles dans le texte.

$$\frac{A}{t_A} = \text{vitesse de l'absorption endogène d'oxygène ou endoabsorption ;}$$
$$\frac{B}{t_B} = \text{vitesse initiale du dégagement transitoire d'oxygène ou jet ;}$$

$\frac{C}{t_c}$ = vitesse de l'absorption d'oxygène à la lumière ou photoabsorption ;

$\frac{F}{t_F}$ = vitesse initiale de l'extraabsorption lors de la remise à l'obscurité, par rapport à l'endoabsorption ;

$\frac{G}{t_G}$ = vitesse initiale de l'extraabsorption lors de la remise à l'obscurité, par rapport à la photoabsorption.

L'appréciation de la quantité totale d'oxygène dégagé pendant le jet est possible par deux voies au moins. Cette quantité serait représentée par :

D. en admettant que l'absorption photochimique d'oxygène ne débiterait qu'après la fin du jet ;

E. en admettant que l'absorption photochimique d'oxygène apparaîtrait dès le début de l'illumination. Il semble que cette deuxième mesure soit plus conforme à la réalité et c'est généralement E qui est pris en considération.

Enfin $\frac{B'}{t_B}, E', D'$ expriment les mêmes valeurs que $\frac{B}{t_B}, E$ et D mais se rapportent au deuxième jet. $\frac{B'/t_B}, \frac{E'}{E}, \frac{D'}{D}$ reflètent donc la récupération, c'est-à-dire la vitesse de la réaction aboutissant à la réapparition du jet.

Les rapports $\frac{F}{t_F}$ et $\frac{G}{t_G}$ sont deux estimations de l'extraabsorption. Toutefois s'il y a bien, lors de la photoabsorption, simultanément dégagement et absorption d'oxygène (cf. MEHLER et BROWN, 1952), $\frac{G}{t_G}$ traduit la vitesse du dégagement stationnaire d'oxygène pendant cette phase et $\frac{F}{t_F}$ celle de l'absorption stationnaire. Cette interprétation est tout à fait analogue à celle donnée pour les courbes de photo-synthèse au sens classique du terme.

II. — INFLUENCE DE FACTEURS BIOLOGIQUES ET PHYSIQUES

Les effets de l'éclairement, du pH et de la température seront traités dans les paragraphes V, VI et VII.

1. Origine spécifique et mode d'obtention des préparations de chloroplastes

Des chloroplastes extraits de feuilles d'*Oryza sativa* L., *Triticum sativum* L., *Spinacea oleracea* L. ou *Bryophyllum daigremontianum* BERGER (*Kalanchoe daigremontiana* RAYMONT-HAMET et PERRIER DE LA BATHIE) ont présenté les mêmes phénomènes d'induction que ceux observés avec des chloroplastes provenant de *Zea Mays* L., *Beta vulgaris* L. donne également les mêmes résultats (FORK, 1963).

Des chloroplastes isolés en gradient de densité dans une solution de saccharose, ou lyophilisés après séparation puis resuspendus dans de l'eau de manière à obtenir la même concentration en chlorophylle et en tampon qu'avant la dessiccation, ont montré un jet et une photoabsorption comparables à ceux des chloroplastes préparés dans les conditions standardisées.

Des chloroplastes extraits dans une solution tampon à pH 6,6 de tris-maléate 0,1 M contenant du saccharose 0,4 M et resuspendus dans une autre solution où le tris-maléate est remplacé par du phosphate également 0,1 M présentent un jet plus faible, mais une photoabsorption plus importante, que des chloroplastes conservés dans la solution tampon de tris-maléate. Il en est de même si les chloroplastes sont extraits directement dans la solution tampon de phosphate.

Enfin, si l'on fait éclater les chloroplastes dans l'eau pure de façon à obtenir des *chloroplastes brisés*, on constate une diminution de l'intensité de jet. Elle semble

être due, au moins en partie, à une augmentation importante de la photoabsorption d'oxygène (la réaction de HILL avec ces chloroplastes brisés est assez peu diminuée).

2. Age des préparations de chloroplastes

La figure 9 montre la perte d'activité des chloroplastes en fonction du vieillissement des préparations à propos de la vitesse initiale et du volume du jet, d'une part, et de la capacité de photoréduction du ferrieyanure de potassium (mesurée par la méthode manométrique de WARBURG), d'autre part. On voit que le volume du jet varie le moins avec le temps. Par contre, la réaction de HILL chute plus rapidement. Toutefois l'allure des courbes est très semblable et traduit la parenté des phénomènes

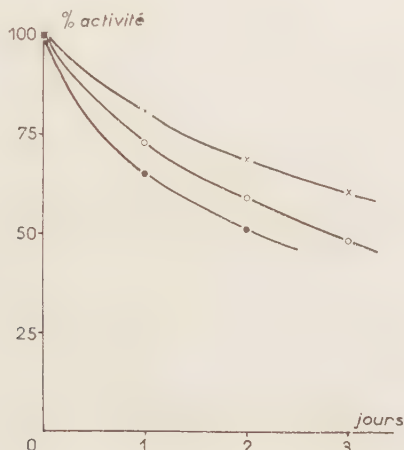


FIG. 9. — Perte d'activité des chloroplastes en fonction de l'âge des préparations.

Chloroplastes dans TMS pH 6,6. Air. 15 °C.

Pour le jet : 200 µg chlorophylle/ml.

Pour la réaction de HILL : 90 µg chlorophylle/ml + $K_3[Fe(CN)_6]$ $8 \cdot 10^{-3}$ M.

— X — : volume du jet ;

— O — : vitesse initiale du jet ;

— ● — : vitesse de la réaction de HILL (mesurée par le dégagement d'oxygène, suivant la méthode manométrique de WARBURG. Eclairage en lumière blanche : 8 000 lux).

Les différences quantitatives peuvent être dues à ce qu'une partie des systèmes enzymatiques nécessaires à la réaction de HILL n'intervient pas dans le jet, qui est un phénomène plus simple. La dégradation serait plus nette sur un système complexe, ce qui n'a rien d'étonnant.

Le fait que le volume du jet reste plus stable que la vitesse initiale proviendrait de ce que le complexe comprenant le substrat fournisseur du photoproduit oxydant serait moins vite détruit que les enzymes nécessaires à la libération d'oxygène.

3. Concentration en chloroplastes

L'influence de la concentration en chloroplastes des suspensions est représentée dans les figures 10 et 11.

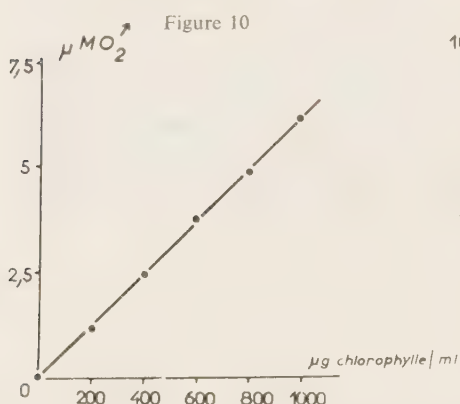


FIG. 10. — Influence de la concentration en chloroplastes des préparations sur le volume du jet. Chloroplastes dans TMS pH 6,6. Azote. 15 °C.

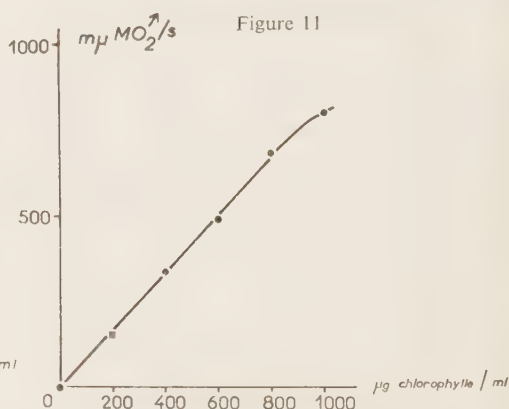


FIG. 11. — Influence de la concentration en chloroplastes des préparations sur la vitesse initiale du jet.

Mêmes conditions que pour la figure 10.

On constate que la vitesse initiale du jet commence à diminuer à partir d'une concentration pour laquelle son volume reste encore proportionnel à la concentration en chloroplastes.

La concentration habituellement utilisée (200 ou 300 μg chlorophylle/ml) est donc telle que l'absorption lumineuse n'est pas limitante.

III. — INFLUENCE DE FACTEURS CHIMIQUES

1. Inhibiteurs

On connaît la grande sensibilité de la photosynthèse à différents inhibiteurs. Parmi les plus spécifiques et les plus puissants, il faut citer les urées substituées comme la 3-(4-chlorophényl)-1,1-diméthylurée ou CMU.

La figure 12 permet la comparaison entre l'activité de chloroplastes en l'absence de CMU et celle de chloroplastes en présence de l'inhibiteur. On constate, comme prévu, que pour le lot avec CMU le jet a pratiquement disparu. Par contre, on remarque que la photoabsorption n'a pas été totalement supprimée. Or, il est connu que l'inhibition d'une des réactions d'un ensemble complexe et lié, comme l'est la photosynthèse, entraîne une diminution indirecte et du même ordre, de la vitesse des autres réactions.

Cela suggère que la photoabsorption d'oxygène pourrait bien ne pas être due au fonctionnement d'un seul système réactionnel. L'existence d'une *photooxydation* supplémentaire paraît donc concevable.

Il est intéressant de noter que la photoabsorption semble débiter avec retard par rapport au jet (environ 1 s). Cela légitime d'ailleurs la méthode de calcul de la vitesse initiale du jet, mais implique que la mesure de son volume par la valeur de E sur la figure 8 est alors légèrement surestimée.

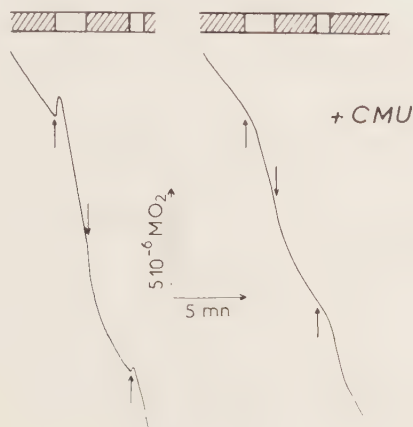


FIG. 12. — Effet de la CMU sur les échanges d'oxygène par les chloroplastes isolés.

Chloroplastes : 200 μg chlorophylle/ml dans TMS pH 6,6. Air. 15 °C.

CMU : $\sim 10^{-3}$ M.

↑ : lumière ;

↓ : obscurité.

Enfin la figure 13 montre que la courbe du taux d'inhibition du jet en fonction de la concentration en CMU présente l'allure sigmoïde classique dans un domaine de molarités tout à fait comparable à celui trouvé également ici pour la photosynthèse chez *Chlorella*.

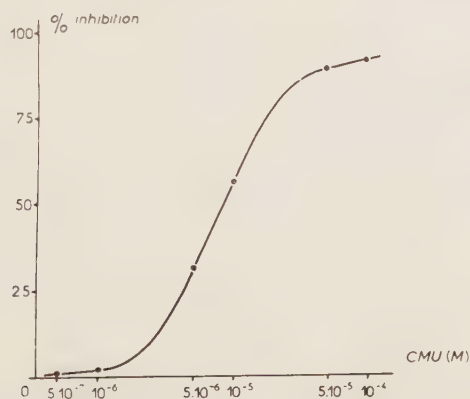


FIG. 13. — Variation du taux d'inhibition de la vitesse initiale du jet en fonction de la concentration en CMU.

Chloroplastes : 270 μg chlorophylle/ml dans TMS pH 6,6. Air. 15 °C.

Préincubation : 30 mn à l'obscurité et à + 2 °C.

En abscisse, échelle logarithmique des concentrations finales de CMU.

D'autres inhibiteurs ont été testés. Le chlorhydrate d'*hydroxylamine*, l'*ortho-phéнанthroline* et le *phényl-uréthane* donnent des résultats semblables à ceux obtenus avec la CMU.

Le cyanure de potassium ne devrait pas avoir d'effet sur le jet des chloroplastes comme il n'en a pas sur celui de *Chlorella* (JOLIOT, 1961_a). Le tableau I exprime les résultats obtenus. On constate que le jet n'est pas touché, mais que la photoabsorption est légèrement exaltée, ce qui peut s'expliquer par l'inhibition de la catalase subsistant encore dans les chloroplastes.

TABLEAU I
Effet du cyanure sur les échanges d'oxygène par les chloroplastes isolés
(en l'absence de réactif de HILL)

Chloroplastes : 180 μg chlorophylle/ml dans TMS pH 6,6. 15 °C. Air.
KCN : 10^{-3} M dans NaOH 10^{-4} N.
Témoin : NaOH 10^{-4} N à la place de KCN.

	Vitesse initiale du jet	Vitesse stationnaire de la photoabsorption
Témoin	100	100
+ KCN	98	114

2. Transporteurs d'électrons

a) Le *nicotinamide adénine dinucléotide phosphate* ou NADP a été essayé. La vitesse du jet est faiblement augmentée, mais la photoabsorption est par contre nettement diminuée (tableau II). Cela s'interprète en admettant le déroulement d'une faible réaction de HILL avec cette coenzyme (SAN PIETRO, 1961).

TABLEAU II
Effet du NADP sur les échanges d'oxygène par les chloroplastes isolés
(en l'absence de réactif de HILL)

Chloroplastes : 180 μg chlorophylle/ml dans TMS pH 6,6. 15 °C. Air.
NADP : $2 \cdot 10^{-4}$ M dans l'eau.
Témoin : eau à la place de NADP.

	Vitesse initiale du jet	Vitesse stationnaire de la photoabsorption
Témoin	100	100
+ NADP	107	75

b) Le *phénazine méthosulfate* ou PMS présente, par contre, des propriétés très curieuses. Pour essayer de comprendre son action, le comportement des Chlorelles a été comparé à celui des chloroplastes, seuls ou additionnés de réactif de HILL.

On sait que le PMS est un cofacteur puissant de la phosphorylation photosynthétique (JAGENDORF et AVRON, 1959 ; ARNON et coll., 1961) et qu'il semble agir en établissant un court-circuit du transfert d'électrons du système photochimique principal (ARNON et coll., 1961 ; RUMBERG, MÜLLER et WITT, 1962). Comme le PMS (absorption maximale à 387 m μ) se transforme photochimiquement en pyocyanine (HILL et WALKER, 1959) c'est dans le rouge, où il n'absorbe pas, que les essais ont été entrepris afin d'éviter cette réaction photochimique parasite. Il était intéressant alors de distinguer une différence éventuelle de l'effet du PMS si l'on excite surtout la chlorophylle *b* (à 647 m μ) ou la chlorophylle *a* (à 679 m μ).

Les résultats sont résumés dans le tableau III. On voit que pour le jet et la photoabsorption, il y a un net effet exaltant du PMS et plus à 679 m μ qu'à 647 m μ . La réaction de HILL n'est pratiquement pas touchée, alors que la photosynthèse de *Chlorella* est très nettement inhibée, plus à 647 m μ qu'à 679 m μ (tableau IV).

TABLEAU III
Effet du PMS sur les échanges d'oxygène par les chloroplastes isolés
(en l'absence de réactif de HILL)

Chloroplastes : 100 μ g chlorophylle/ml dans TMS pH 6,6, 15 °C. Azote.
PMS : $3,3 \cdot 10^{-5}$ M (préincubation : environ 40 mn à + 2 °C et à l'obscurité)
Témoin : eau à la place de PMS.

Lumière colorée : filtres interférentiels ($T \approx 40$ %, $\Delta\lambda$ à $\frac{T}{2} \approx 12$ m μ) ;

éclairage en ergs $\cdot$ s $^{-1}$ $\cdot$ cm $^{-2}$: à 647 m $\mu \approx 7,4 \cdot 10^3$; à 679 m $\mu \approx 6,8 \cdot 10^3$.

Variations (en %) par rapport au témoin

	647 m μ	679 m μ
Vitesse initiale du jet	+ 48	+ 112
Vitesse stationnaire de la photoabsorption	+ 29	+ 95

TABLEAU IV
Effet du PMS sur la réaction de Hill et la photosynthèse

15 °C. Air. (PMS, témoin, lumière colorée : voir le tableau III).

Réaction de HILL. Chloroplastes : 270 μ g chlorophylle/ml dans TMS pH 6,6 + DPIP $2 \cdot 10^{-4}$ M.

Photosynthèse. Chlorelles : 90 μ g chlorophylle/ml dans une solution tampon de phosphate 0,075 M pH 6,5.

Variations (en %) par rapport au témoin

	647 m μ	679 m μ
Vitesse de la réaction de HILL	— 2	+ 4
Vitesse de la photosynthèse	— 48	— 23

GINGRAS a constaté que le PMS inhibe la fixation de $^{14}\text{CO}_2$ par *Scenedesmus* en photoréduction (non publié). Il a également constaté un effet inhibiteur du PMS sur le dégagement d'oxygène par *Chlorella*. Cet effet est plus prononcé en excitant la chlorophylle *b* que la chlorophylle *a*. Ces résultats sont donc en accord avec les expériences relatées ci-dessus. Le PMS serait un inhibiteur du système photochimique principal, sensibilisé par la chlorophylle *a*, comme la CMU en est un du système photochimique accessoire, sensibilisé par la chlorophylle *b* (GINGRAS, LE-MASSON et FORK, 1963). L'insensibilité au PMS de la réaction de HILL avec du DPIP peut s'expliquer par le fait que seul le système photochimique accessoire interviendrait (cf. RUMBERG, MÜLLER et WITT, 1962) pour la photoréduction de ce colorant.

L'effet activateur du PMS sur les échanges d'oxygène par les chloroplastes isolés, en l'absence de réactif de HILL, ne s'explique pas aisément. Si l'augmentation du jet est due à une réduction photochimique du PMS à laquelle correspondrait un dégagement d'oxygène, d'une part celui-ci devrait être d'un ordre de grandeur plus élevé que celui que l'on mesure, d'autre part la photoabsorption devrait être diminuée et non stimulée.

Il se pourrait que le PMS soit le maillon commun à plusieurs séries de réactions. Suivant les conditions, le PMS catalyserait une oxydoréduction cyclique ou une accumulation d'un oxydant réduit. Ainsi, la compétition entre la réduction du CO_2 au cours de la photosynthèse et l'oxydoréduction cyclique serait en faveur de cette dernière éventualité.

Par contre, la photoabsorption prédominerait dans le cas des chloroplastes isolés, et sans réactif de HILL. Elle serait exaltée par le PMS qui jouerait le rôle d'un intermédiaire utile mais non indispensable. D'ailleurs, il se pourrait qu'en photophosphorylation, le couplage de la formation d'adénosine triphosphate augmente la vitesse de l'oxydoréduction cyclique (cf. AVRON et JAGENDORF, 1959), ce qui diminuerait alors la photoabsorption.

IV. — ACTIVITÉ CATALASIQUE DES CHLOROPLASTES ET INFLUENCE DE LA CATALASE EXOGÈNE

1. Mesure de l'activité catalasique

Les catalases végétales semblent être légèrement différentes des autres catalases, en particulier en ce qui concerne leur activité (GALSTON, BONNICHSEN et ARNON, 1951). Néanmoins leurs propriétés sont fondamentalement les mêmes. C'est pourquoi l'activité catalasique des chloroplastes isolés a été comparée à celle d'une catalase d'origine animale.

La mesure de l'activité catalasique a été faite en suivant en fonction du temps la disparition de l'eau oxygénée ajoutée à la préparation.

Pour doser l'eau oxygénée restante, on s'est servi de la propriété de ce peroxyde de former avec les sels de titane, en milieu fortement acide, un complexe $[\text{TiO}_2^{++}]$ soluble, jaune-orangé (cf. CHARLOT et GAUGUIN, 1952). A *n* ml de mélange réactionnel (suspension de chloroplastes ou solution de catalase) contenant de l'eau oxygénée on ajoute *n* ml de réactif. Celui-ci est une solution, saturée à chaud, de $\text{Ti}_2(\text{SO}_4)_3$ dans H_2SO_4 4 N, et diluée une fois avec de l'eau, après élimination du sel solide restant et des impuretés. Une centrifugation sépare les chloroplastes (ceux-ci sont

dénaturés en milieu fortement acide). La densité optique (DO) du surnageant est mesurée à 408 m μ et permet de calculer la concentration de H₂O₂ par comparaison avec des solutions étalons (DO pour une concentration finale 10⁻³ M. dans le réactif, de H₂O₂ = 0,8).

La figure 14 établit une comparaison entre l'activité catalasique d'une suspension de chloroplastes à 250 μ g chlorophylle/ml et celle d'une solution de catalase à 2,5 μ g/ml. Cette dernière préparation est donc environ 7 fois plus active que les chloroplastes.

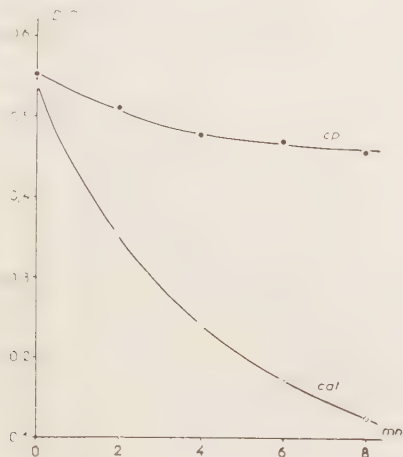


FIG. 14. — Activités catalasiques des chloroplastes et d'une catalase de foie de bœuf.

Chloroplastes : 250 μ g chlorophylle/ml dans TMS pH 6,6 (—●—)

ou catalase : 2,5 μ g/ml dans TMS pH 6,6 (—○—).

Air. 15 °C. H₂O₂ au temps 0 : 8,25·10⁻⁴ M.

Aux différents temps (en abscisse), prélèvement de parties aliquotes et addition du réactif au Ti. Centrifugation. Mesure de la densité optique du surnageant à 408 m μ (en ordonnée). (Pour les détails, voir le texte).

En portant log DO en fonction du temps, on obtient une droite permettant de calculer la constante de vitesse k . Dans les conditions opératoires décrites, on a obtenu les valeurs suivantes, données à titre d'exemple :

$$k_{\text{mg chlorophylle/ml chlorelles}} \approx 3,2 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$$

$$k_{\text{mg chlorophylle/ml chloroplastes}} \approx 1,7 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$$

$$k_{\text{mg catalase/ml catalase (foie de bœuf)}} \approx 1,1 \text{ s}^{-1}.$$

Comme les catalases végétales seraient environ 4 fois moins actives que les autres catalases (GALSTON, BONNICHSEN et ARNON, 1951) tout se passe comme si on n'avait plus qu'une molécule de catalase pour environ 20 000 molécules de chlorophylle.

2. Influence de la catalase exogène sur les échanges d'oxygène par les chloroplastes

D'après les données rassemblées dans le tableau V, la catalase ne modifie pas la vitesse initiale du jet mais diminue la vitesse stationnaire de la photoabsorption.

TABLEAU V

*Effet de la catalase sur les échanges d'oxygène par les chloroplastes isolés
(en l'absence de réactif de HILL)*

Chloroplastes : 270 μg chlorophylle/ml dans TMS pH 6,6. 15 °C. Air.

Catalase : 3 μg /ml.

Témoin : tampon à la place de catalase.

	Vitesse initiale du jet	Vitesse stationnaire de la photoabsorption
Témoin	100	100
+ catalase	100	68

TABLEAU VI

Récapitulation des effets de différentes substances sur le jet et la photoabsorption

0 = pas d'effet ; — = inhibition ; + = activation.

o-ph = o-phénanthronine ; φ -ur = phényl-uréthane ; HA = chlorhydrate d'hydroxylamine

	Jet	Photoabsorption
catalase	0	—
NADP	+	—
PMS	+	+
KCN	0	—
CMU	—	—
o-ph	—	—
φ -ur	—	—
HA	—	—

La figure 15 montre d'une manière plus imagée l'effet de l'addition d'une petite quantité de catalase à une suspension de chloroplastes. Elle permet de constater que la courbe reflétant la concentration d'oxygène, lors de la remise à l'obscurité, change de pente très rapidement par suite de l'apparition d'un dégagement d'oxygène qui finit par devenir plus important que l'absorption. D'autres expériences faites avec des concentrations plus fortes de catalase donnent qualitativement les mêmes résultats. Mais, comme dans le cas de la CMU par exemple, il n'est pas possible d'annuler entièrement la photoabsorption. On est amené, là aussi, à supposer que

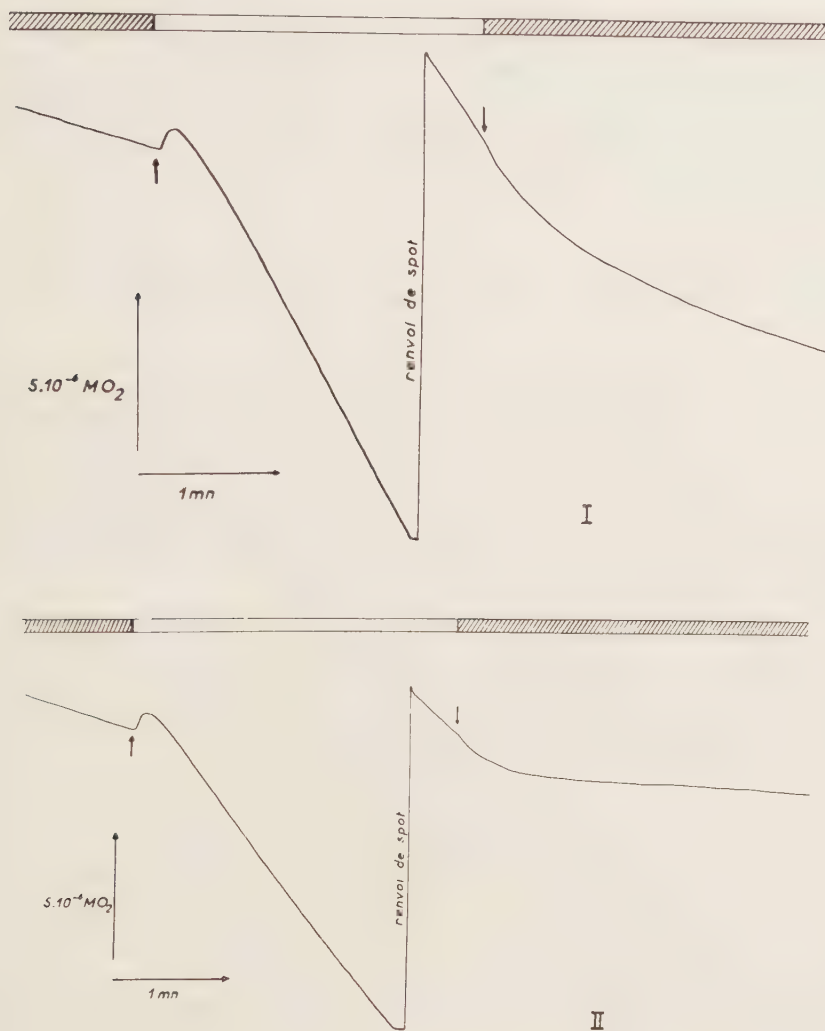


FIG. 15. — Effet de l'addition de catalase exogène à une préparation de chloroplastes.

Chloroplastes : 270 μg chlorophylle/ml dans TMS pH 6,6. Air. 15 °C.

Catalase : concentration finale = 3 μg /ml.

I : témoin (eau à la place de catalase) ;

II : + catalase.

↑ : lumière ;

↓ : obscurité.

cette photoabsorption est complexe et pourrait être due à la superposition d'au moins deux phénomènes distincts. Toutefois, si le dégagement d'oxygène observé à l'obscurité est la conséquence de la dismutation d'eau oxygénée formée à la lumière, on peut penser que la synthèse du peroxyde est plus rapide que sa dégradation. Dans ce cas, il est normal qu'une photoabsorption subsiste à la lumière. Néanmoins, on

verra ci-dessous que la probabilité d'une photooxydation supplémentaire, distincte de la réaction de MEHLER, est confirmée par les courbes obtenues en portant l'intensité de la photoabsorption en fonction de l'éclairement.

Le tableau VI résume les effets de l'addition de catalase et des différentes substances énumérées dans le paragraphe III.

V. — INFLUENCE DE L'ÉCLAIREMENT

Si l'on mesure la vitesse initiale du jet et la vitesse stationnaire de la photoabsorption à divers éclairagements, on constate un comportement différent de ces deux phénomènes (fig. 16).

Alors que la vitesse initiale du jet devient constante à partir d'une certaine valeur de l'éclairement, on remarque que la photoabsorption croît encore. Toutefois, il apparaît une rupture de pente à peu près à l'endroit où la première réaction commence à se saturer. Cela dénote une dualité de la photoabsorption : ainsi qu'il était pressenti dans les paragraphes III-1 et IV-2, on aurait donc deux réactions d'absorption photochimique d'oxygène. L'une aurait probablement la même origine que le dégagement d'oxygène et se saturerait pour la même valeur de l'éclairement. L'autre serait une photooxydation d'origine différente et dont la saturation éventuelle ne se produirait qu'avec une lumière bien plus intense.

Il faut citer un autre argument à ce propos : si l'on chauffe des chloroplastes 10 mn à 60 °C, on supprime totalement le jet, mais il subsiste néanmoins une forte absorption d'oxygène à la lumière.

Il faut observer que les phénomènes de photooxydation ont déjà été signalés par plusieurs auteurs (cf. RABINOWITCH).

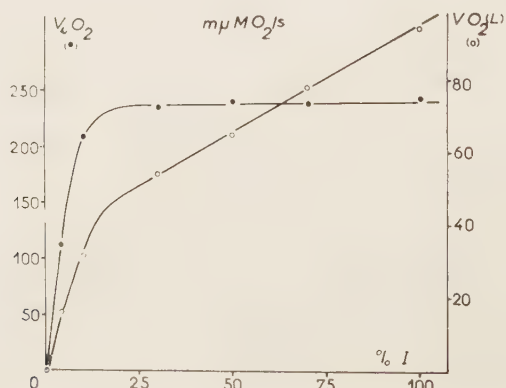


FIG. 16. — Variations de la vitesse initiale du jet et de la vitesse de photoabsorption en fonction de l'éclairement.

Chloroplastes : 200 μg chlorophylle/ml dans TMS pH 6,6. Air. 15 °C.

I : éclairement en lumière blanche (100 % $\approx 4 \cdot 10^5 \text{ ergs} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$).

$V_i \text{O}_2$: vitesse initiale du jet $\left(= \frac{B}{t_B} \text{ de la figure 8} \right)$;

$V \text{O}_2(L)$: vitesse stationnaire de la photoabsorption $\left(= \frac{C}{t_C} \text{ de la figure 8} \right)$.

L'effet d'une brusque augmentation de l'éclairement est illustré par la figure 17. Si l'accroissement est donné pendant la montée du jet, on voit quasi instantanément une brutale augmentation de vitesse. Si la variation a lieu lorsque la photoabsorption est déjà établie, on constate l'apparition d'un nouveau jet ; de plus on note une augmentation de la photoabsorption ultérieure. Il y a donc un équilibre entre la vitesse de reformation du complexe initial (postulé dans l'introduction du présent travail) et sa destruction photochimique. Ces résultats et les conclusions que l'on peut en tirer sont parfaitement conformes à ce qui a été rapporté par JOLIOT (1961_a) pour *Chlorella*.

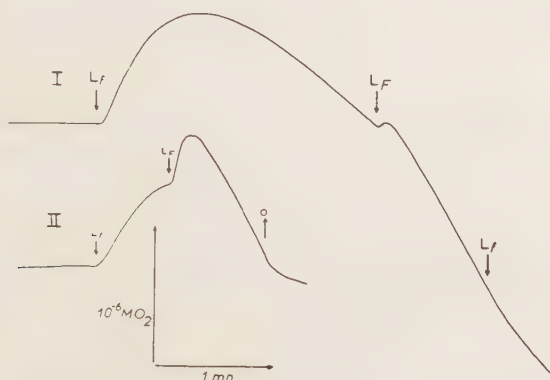


FIG. 17. — Effet d'une brusque variation d'éclairement sur les échanges d'oxygène par les chloroplastes isolés.

Chloroplastes : 300 μg chlorophylle/ml dans TMS pH 6,6. Azote. 15 °C.

L_F = lumière blanche forte ($\approx 4 \cdot 10^5 \text{ ergs} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$) ;

L_f = lumière blanche faible (= 3 % de L_F) ;

0 = obscurité.

I : variation de lumière pendant la photoabsorption ;

II : variation de lumière pendant le jet.

VI. — INFLUENCE DU pH

Il est nécessaire de rappeler ici que les premiers résultats ont permis de mettre en évidence au moins trois réactions, en plus de la réaction photochimique. C'est ainsi qu'on a observé :

- un dégagement d'oxygène,
- une absorption d'oxygène,
- une réapparition du jet.

La première de ces réactions se traduit essentiellement par l'existence d'un dégagement transitoire d'oxygène (dont la vitesse initiale est mesurée par $\frac{B}{t_B}$, figure 8). Mais, de plus, on a vu qu'il était possible de considérer un dégagement stationnaire (dont la vitesse est mesurée par $\frac{G}{t_G}$, figure 8).

De même, la photoabsorption brute d'oxygène observée est la résultante de plusieurs réactions. Elle traduit le bilan d'une absorption stationnaire nette et d'un

dégagement également stationnaire, d'une part, d'une photooxydation supplémentaire, d'autre part. Aussi la somme « absorption d'oxygène par la réaction de MEHLER + photooxydation » est mesurée à partir de la rupture de pente lors de la remise à l'obscurité $\left(\frac{F}{t_F}, \text{ figure 8}\right)$. Quant à la photoabsorption brute, elle est calculée à partir de la droite stationnaire à la lumière, compte tenu de l'endoabsorption $\left(\frac{C}{t_C}, \text{ figure 8}\right)$. On a :

$$\frac{C}{t_C} = \frac{F}{t_F} - \frac{G}{t_G}$$

Comme, en réaction de MEHLER, on a deux fois plus d'oxygène absorbé que d'oxygène dégagé, on peut estimer l'importance de la photooxydation en retranchant à la valeur de $\frac{F}{t_F}$ le double de celle de $\frac{G}{t_G}$. Il a été ainsi possible de calculer que la photooxydation contribue, pour 30 à 50 %, suivant les lots, à la photoabsorption brute. Ce résultat est comparable à celui obtenu par la mesure de la photoabsorption résiduelle en présence de CMU.

Ce sont les valeurs de $\frac{B}{t_B}$, $\frac{C}{t_C}$, $\frac{F}{t_F}$, et $\frac{G}{t_G}$ qui ont été portées en fonction du pH sur les figures 18 et 19.

La troisième réaction fondamentale est déterminée par le rapport de la vitesse initiale du nouveau jet à celle du premier $\left(\frac{B'/t_{B'}}{B/t_B}, \text{ figure 8}\right)$, l'intervalle d'obscurité entre les deux illuminations étant de 3 mn. Sa dépendance à l'égard du pH est illustrée par la figure 20.

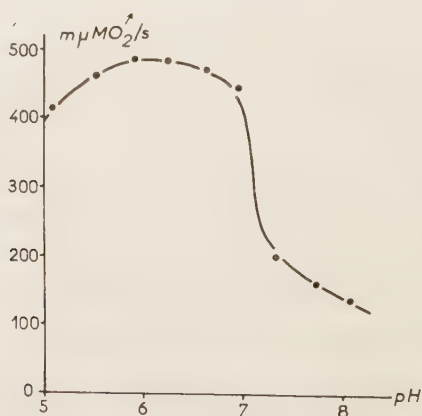


FIG. 18. — Effet du pH sur la vitesse initiale du jet.

Chloroplastes : 300 μg chlorophylle/ml dans TMS au pH indiqué en abscisse. Air. 15 °C.
Mesure de $\frac{B}{t_B}$ de la figure 8.

La figure 18 montre que l'optimum de pH pour le jet est situé vers les régions acides (cf. la réaction de HILL). Il y a une chute très nette à partir de pH 7. En portant le volume du jet en fonction du pH, on obtient une courbe tout à fait semblable.

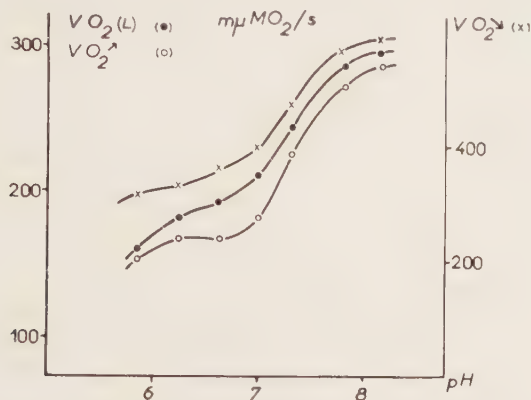


FIG. 19. — Effet du pH sur la photoabsorption et sur l'extraabsorption.

Mêmes conditions que pour la figure 18.

$V O_2 (L)$: vitesse stationnaire de la photoabsorption $\left(= \frac{C}{t_C} \text{ de la figure 8} \right)$;

$V O_2 \nearrow$: vitesse initiale de l'extraabsorption par rapport à la photoabsorption $\left(= \frac{G}{t_G} \text{ de la figure 8} \right)$;

$V O_2 \searrow$: vitesse initiale de l'extraabsorption par rapport à l'endoabsorption $\left(= \frac{F}{t_F} \text{ de la figure 8} \right)$.

Par contre, la photoabsorption brute, le dégagement stationnaire et l'absorption stationnaire d'oxygène donnent des courbes très différentes de celles du jet, mais très semblables entre elles. On note un léger épaulement dans la zone de pH où le jet est maximal, plus net pour le dégagement stationnaire. Puis l'activité des trois réactions augmente beaucoup pour atteindre un maximum vers pH 8 (fig. 19).

Enfin la réaction aboutissant à la réapparition du jet (récupération) se distingue un peu des précédentes en montrant un léger plateau vers pH 7 (fig. 20).

On voit que l'examen de l'effet du pH permet de distinguer plus nettement les réactions déjà mises en évidence. Cela est possible, parce qu'au cours de l'induction on peut mesurer séparément les phénomènes les plus rapides (comme le jet) alors qu'à l'état stationnaire, la réaction la plus lente gouverne la vitesse globale du phénomène. C'est pourquoi, probablement, le dégagement stationnaire d'oxygène se distingue du dégagement transitoire en manifestant une dépendance vis-à-vis du pH proche de celle de la photoabsorption. En ce qui concerne la récupération, on constate également une certaine originalité par rapport aux autres réactions, mais moins marquée.

Il est instructif de comparer ces résultats avec ceux d'autres auteurs (AVRON, JAGENDORF et EVANS, 1957 ; ALLEN, WHATLEY et ARNON, 1958) à propos de l'intensité de la phosphorylation photosynthétique des chloroplastes isolés en fonction du pH. Alors que le pH optimal pour le jet est situé vers 6, celui de la photoabsorption l'est vers 8, comme l'est également celui de la photophosphorylation.

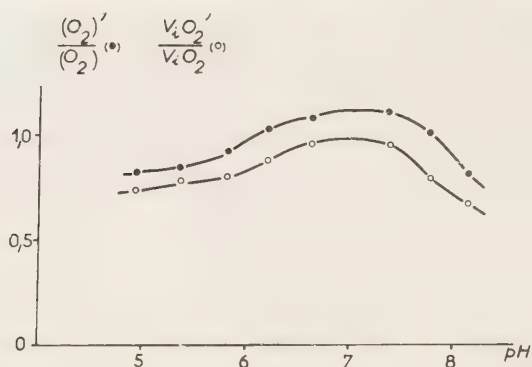


FIG. 20. — Effet du pH sur la récupération.

Mêmes conditions que pour la figure 18. Intervalle d'obscurité = 3 mn.

$\frac{(O_2)'}{(O_2)}$: rapport du volume du deuxième jet à celui du premier $\left(= \frac{E'}{E} \text{ de la figure 8} \right)$;

$\frac{V_1 O_2'}{V_1 O_2}$: rapport de la vitesse initiale du deuxième jet à celui du premier $\left(= \frac{B'/t_{B'}}{B/t_B} \text{ de la figure 8} \right)$.

VII. — INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE

Ainsi qu'on l'a vu ci-dessus, il est possible de distinguer les différentes réactions entrant en jeu lors de l'illumination des chloroplastes isolés. Très certainement, les caractéristiques thermodynamiques de ces réactions ne sont pas les mêmes. On doit alors pouvoir observer un comportement différent de chacune d'entre elles vis-à-vis de la température.

Des expériences sont faites à 5, 15, 25, 35 et 45 °C. Les résultats obtenus sont résumés par les figures 21 à 26.

Les phénomènes analysés sont les suivants :

1. vitesse stationnaire de l'endoabsorption $\left(\frac{A}{t_A}, \text{ figure 8} \right)$;
2. vitesse initiale du jet $\left(\frac{B}{t_B}, \text{ figure 8} \right)$;
3. vitesse stationnaire de la photoabsorption $\left(\frac{C}{t_C}, \text{ figure 8} \right)$;
4. vitesse stationnaire du dégagement d'oxygène $\left(\frac{G}{t_G}, \text{ figure 8} \right)$;
5. vitesse stationnaire de l'absorption d'oxygène $\left(\frac{F}{t_F}, \text{ figure 8} \right)$;
6. activité de la réaction de récupération $\left(\frac{B'/t_{B'}}{B/t_B}, \text{ figure 8} \right)$.

Pour cette dernière mesure, l'intervalle d'obscurité séparant la deuxième illumination de la première est toujours de 3 mn.

Pour les vitesses définies en 2, 3, 4 et 5 on a de plus étudié l'influence de la CMU.

— La figure 21 montre que l'endoabsorption (absorption d'oxygène par les chloroplastes isolés, à l'obscurité) se comporte comme un phénomène biologique.

On assiste probablement à la compétition entre deux réactions : l'une correspond à l'activité enzymatique des chloroplastes aboutissant à l'absorption d'oxygène, l'autre à une dénaturation thermique des enzymes tendant à une diminution de leur activité. A partir de 35 °C la deuxième réaction devenant plus importante que la première, la vitesse d'endoabsorption diminue avec l'élévation de la température.

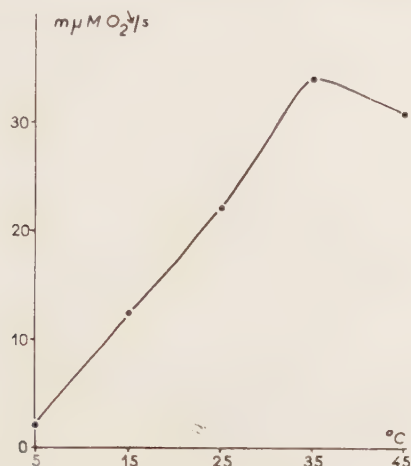


FIG. 21. — Effet de la température sur l'endoabsorption.

Chloroplastes : 300 μg chlorophylle/ml dans TMS pH 6,6. Air.

Mesure de $\frac{A}{t_A}$ de la figure 8.

— La figure 22 représente la variation de la vitesse initiale du jet en fonction de la température. Cette vitesse passe par un optimum thermique vers 30 °C, pour

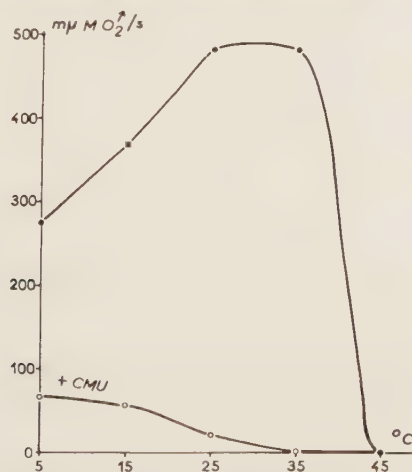


FIG. 22. — Effet de la température sur la vitesse initiale du jet.

Mêmes conditions que pour la figure 21.

CMU : $2 \cdot 10^{-5}$ M.

Mesure de $\frac{B}{t_B}$ de la figure 8.

des raisons analogues à celles exposées ci-dessus. Dans la région du plateau situé entre 25 et 35 °C, on peut estimer que le jet est insensible à la température. Ce fait est à rapprocher des observations de JOLIOT (1961_a et _b) en faible lumière.

On voit aussi sur la figure 22 que la CMU a un pouvoir inhibiteur plus important à haute qu'à basse température. L'inhibition atteint 100 % à 35 °C pour la concentration utilisée, alors qu'elle n'est que de 75 % à 5 °C. On peut interpréter cette augmentation de l'inhibition, en écrivant une séquence de réactions telle que :



où A = substrat (H₂O, par exemple) ;

B = intermédiaire ;

C = produit (O₂) ;

E = enzyme.

Trois possibilités, très schématisées, d'inhibition des réactions thermiques se présentent (en négligeant donc celle qui porterait sur la réaction photochimique). Elles résultent de la formation d'éventuels complexes avec la CMU :



Toutes ces réactions doivent être réversibles, puisque l'inhibition avec la CMU est levée par lavage. Dans le premier cas, l'inhibition devrait être maximale dès le temps 0 de l'illumination, car [E — CMU] se formerait déjà à l'obscurité. Dans les deux autres cas, l'inhibition augmenterait avec la durée de l'illumination. On ne peut à l'heure actuelle choisir entre ces trois hypothèses.

De toute façon, la formation d'un complexe avec la CMU explique l'augmentation de l'inhibition avec la température, car on peut admettre une différence entre l'énergie d'activation de la formation du complexe avec la CMU et celle de la formation du complexe de B avec E. Une élévation de la température, en favorisant l'accumulation du complexe avec la CMU, augmentera donc l'inhibition.

— La figure 23 met en évidence une augmentation de la vitesse de la photo-absorption brute avec l'élévation de la température, mais il est plus intéressant de comparer les courbes d'absorption stationnaire nette et de dégagement stationnaire d'oxygène.

— La figure 24 montre que la vitesse du dégagement stationnaire d'oxygène décroît lorsque la température croît. Ces courbes contrastent donc avec celles de la figure 22. Il est possible que la décroissance d'activité soit due au fait que le système intervenant dans le dégagement d'oxygène est plus thermosensible lorsque les enzymes sont combinées avec les substrats que lorsqu'elles sont sous forme libre.

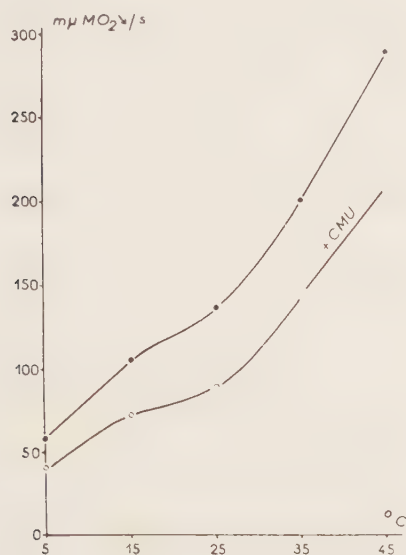


FIG. 23. — Effet de la température sur la vitesse stationnaire de la photoabsorption.

Mêmes conditions que pour la figure 21

CMU : $2 \cdot 10^{-5}$ M.

Mesure de $\frac{C}{t_c}$ de la figure 8.

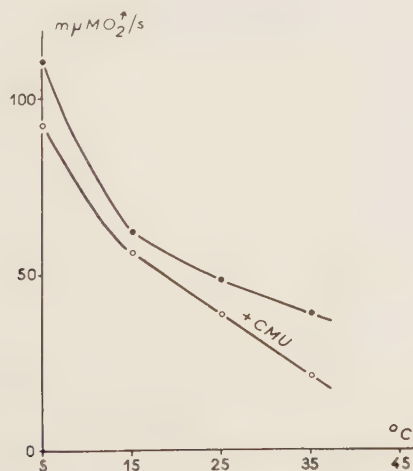


FIG. 24. — Effet de la température sur la vitesse stationnaire du dégagement d'oxygène.

Mêmes conditions que pour la figure 21.

CMU : $2 \cdot 10^{-5}$ M.

Mesure de $\frac{G}{t_c}$ de la figure 8.

— La figure 25 est assez semblable à la figure 23. La même loi s'applique donc, apparemment, à la photoabsorption brute et à la photoabsorption nette.

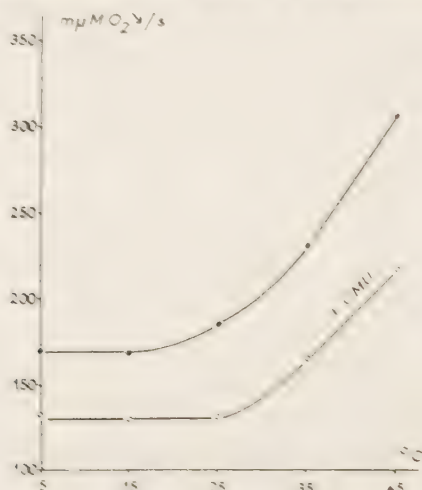


FIG. 25. — Effet de la température sur la vitesse stationnaire de l'absorption d'oxygène.

Mêmes conditions que pour la figure 21.

CMU : $2 \cdot 10^{-3}$ M.

Mesures de $\frac{F}{F_{\infty}}$ de la figure 8.

— Enfin la figure 26 montre que la réaction de récupération, mesurée par le rapport des vitesses initiales des jets, diffère des autres réactions. Toutefois, la courbe obtenue se rapproche assez de celle de la figure 22 (jet initial). Peut être cette

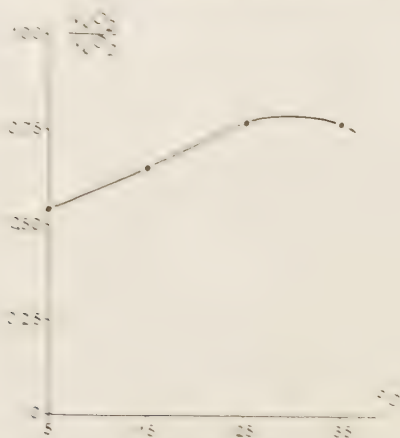


FIG. 26. — Effet de la température sur la récupération.

Mêmes conditions que pour la figure 21.

Mesure du rapport des vitesses initiales des jets $\left(\frac{v_0}{v_{\infty}} \right)$ de la figure 8

Intervalle d'obscurité = 3 mn.

similitude est-elle due à la méthode de calcul : il faut mesurer le premier et le deuxième jet pour obtenir le rapport reflétant l'activité de la récupération.

Dans la figure 26 il n'est pas possible de donner les valeurs pour 45 °C et celles pour les chloroplastes additionnés de CMU : les nombres obtenus sont trop petits et l'erreur est trop grande pour que les rapports revêtent une signification exploitable.

VIII. — ANALYSE CINÉTIQUE

Les trois réactions mises en évidence (mis à part la réaction photochimique et la photooxydation supplémentaire) ont été étudiées d'un point de vue cinétique. Elles ont pour conséquence :

- le dégagement d'oxygène (c'est-à-dire l'évolution du photoproduit oxydant) ;
- l'absorption d'oxygène (c'est-à-dire l'évolution du photoproduit réducteur) ;
- la récupération (c'est-à-dire la reformation du complexe initial).

La figure 8 et le paragraphe 1-3 donnent les méthodes graphiques utilisées.

La première réaction est analysée, dans les meilleures conditions, pendant le jet. Pour cela on porte en fonction du temps le volume d'oxygène libérable, représenté par p (figure 8, partie hachurée). Cette grandeur p est déterminée, à chaque temps, par la différence d'ordonnée entre le tracé enregistré et la droite de la photo-absorption stationnaire, extrapolée jusqu'au temps 0. A chaque instant, p mesure donc la quantité d'oxygène pouvant être encore dégagé et, par conséquent, la quantité restante du complexe initial hypothétique (à $t = 0$, $p = p_0 = E$, figure 8). On obtient ainsi la courbe de la figure 27. En représentation semi-logarithmique (fig. 28) on a une droite, sauf dans les premières secondes pendant lesquelles intervient particulièrement le temps de réponse de l'appareillage. Vers le maximum du jet, les points expérimentaux ne se placent plus sur la droite, mais cela est probablement dû aux

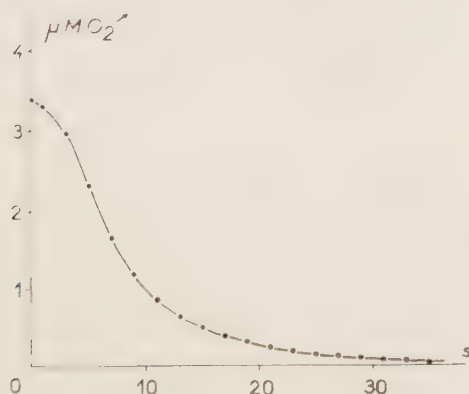


FIG. 27. — Décroissance de la concentration du photoproduit oxydant, pendant le jet, en fonction du temps.

Chloroplastes : 300 μ g chlorophylle/ml dans TMS pH 6,6. Air. 15 °C.

Mesure du volume d'oxygène libérable au cours du jet à différents temps (p , partie hachurée de la figure 8).

faibles valeurs de p et à l'influence de la photoabsorption. On peut calculer le temps pour lequel $p = \frac{p_0}{2}$ ou $t_{1/2}$ (ici = 4,2 s) et en déduire la constante de vitesse. On a finalement, $p = p_0 e^{-k_1 t}$ avec $k_1 \text{ mg chlorophylle ml} \approx 5,5 \cdot 10^{-1} \text{ s}^{-1}$.

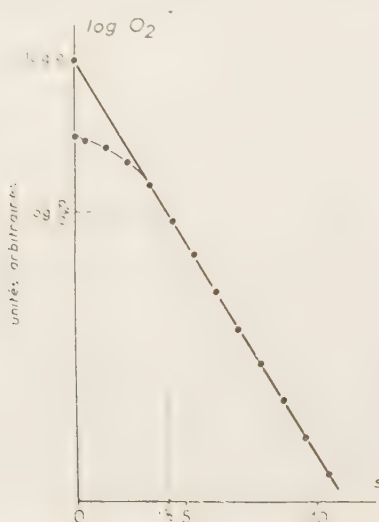


FIG. 28. — Représentation semi-logarithmique de la courbe de la figure 27.

— La deuxième réaction est analysée de la même manière. Pour cela, on se rapporte à la courbe enregistrée à partir de la remise à l'obscurité. On mesure à des temps connus la différence d'ordonnée q entre la courbe et son asymptote (figure 8, partie hachurée). Chaque valeur de q représente donc la quantité d'oxygène susceptible d'être absorbé et, par conséquent, celle du photoproduit reducteur restant (à $t = 0$, $q = q_0$). On obtient ainsi la courbe de la figure 29. En représentation semi-

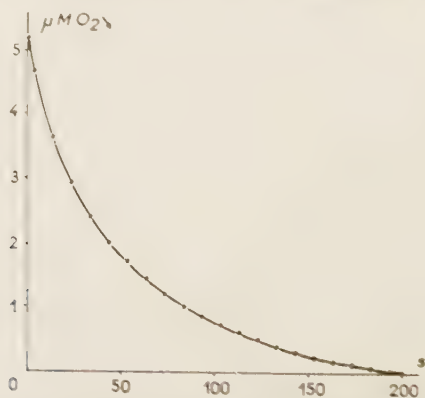


FIG. 29. — Décroissance de la concentration du photoproduit reducteur, pendant l'extraabsorption, en fonction du temps.

Mêmes conditions que pour la figure 27.

Mesure du volume d'oxygène absorbable au cours de l'extraabsorption à différents temps (q , partie hachurée de la figure 8).

logarithmique (fig. 30) on a une droite permettant de calculer un $t_{1/2}$ ($= 41$ s, ici). On en déduit la relation $q = q_0 e^{-k_2 t}$, où $k_2^{\text{mg chlorophylle/ml}} \approx 5,7 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$. Dans les premiers temps (fig. 30), la courbe expérimentale se place au dessus de la branche extrapolée de la partie linéaire, la photooxydation supplémentaire ne cessant peut-être pas immédiatement lors de l'arrêt de l'illumination (de toute façon elle ne doit probablement pas continuer très longtemps). Il faut signaler que pour cette deuxième réaction également, les points expérimentaux calculés lorsque la courbe enregistrée est proche de l'asymptote ne se placent plus sur la droite de la représentation semi-logarithmique.

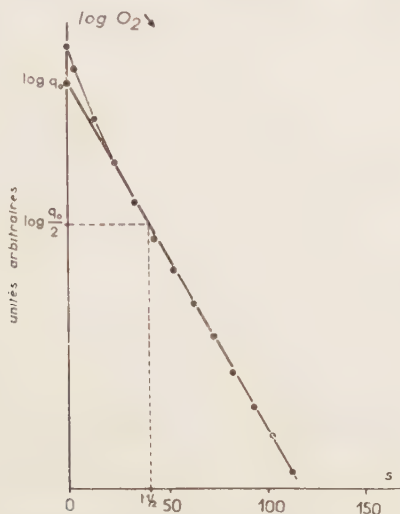


FIG. 30. — Représentation semi-logarithmique de la courbe de la figure 29.

La troisième réaction est celle de la reformation du complexe initial (récupération). Pour en déterminer les caractéristiques, on mesure la vitesse initiale et le volume du nouveau jet apparaissant lors de la nouvelle illumination succédant à une période déterminée d'obscurité, elle-même située après un premier éclaircissement. Le rapport de la nouvelle vitesse initiale à la première ou celui du nouveau volume au premier $\left(\frac{B'/t_B'}{B/t_B} \text{ ou } \frac{E'}{E} \right)$, figure 8) traduit la vitesse de cette réaction. En portant

ce rapport en fonction de la durée de l'intervalle d'obscurité on a les courbes de la figure 31, obtenues dans l'air et dans l'azote. On constate que la vitesse de récupération est notablement plus faible en atmosphère pauvre en oxygène qu'en atmosphère riche en oxygène. On a observé aussi que, suivant les conditions, le rapport des volumes est plus grand que celui des vitesses ou vice versa. De toute façon, les courbes sont suffisamment semblables pour justifier l'hypothèse de leur origine commune.

Il a été vainement tenté d'obtenir un tracé linéaire en appliquant les méthodes adéquates de calcul des réactions d'ordre 1 ou 2. Il est possible que cette réaction change d'ordre : pour des temps très courts, on se rapproche, en effet, d'une cinétique d'ordre 1 mais ce n'est rapidement plus le cas.

PESSEN (1961) a proposé une méthode générale de calcul des ordres de réaction et des constantes de vitesse. On part de la relation $\frac{dx}{dt} = k(x_0 - x)^n$ où x est la

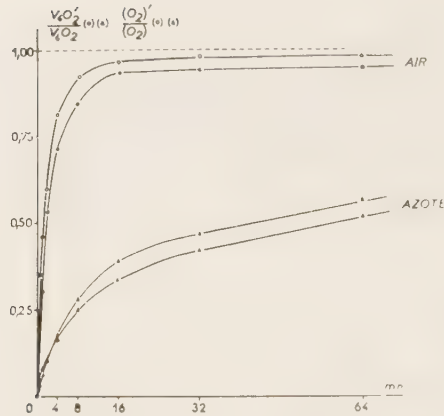


FIG. 31. — Vitesse de la récupération.

Chloroplastes : 300 μg chlorophylle/ml dans TMS pH 6,6. 15 °C.

$\frac{V_i O_2'}{V_i O_2}$: rapport de la vitesse initiale du nouveau jet à celle du premier $\left(= \frac{B'/t_{B'}}{B/t_B} \right.$ de la figure 8) ;

$\frac{(O_2)'}{(O_2)}$: rapport du volume du nouveau jet à celui du premier $\left(= \frac{E'}{E} \right.$ de la figure 8).

concentration du corps au temps t (à $t = 0$, $x = x_0$), n l'ordre de la réaction et k la constante de vitesse. De cette équation, on peut tirer la relation suivante :

$$\frac{x_0}{x} t = \frac{1}{k x_0^{n-1}} + \frac{n}{2} t + \frac{n(2-n)}{12} k x_0^{n-1} t^2 + \dots$$

En portant $\frac{x_0}{x} t$ en fonction du temps, on obtient une droite dont l'intersection avec l'axe des ordonnées et la pente permettent de déterminer k et n , connaissant x_0 . Or x_0 est mesuré ici par le volume d'oxygène dégagé lors de la première illumination. On a donc pu utiliser la représentation de PESSEN (fig. 32) et calculer n et k (c'est-à-

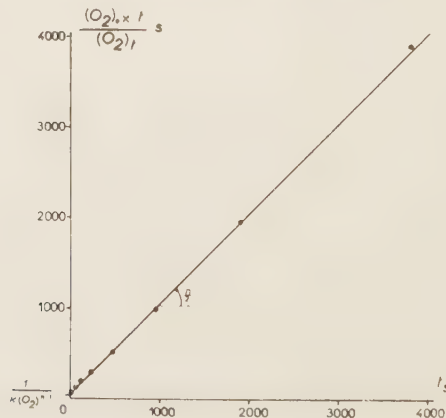


FIG. 32. — Transformation de la courbe de la figure 31 selon la représentation de PESSEN. Explication dans le texte.

dire k_3 , puisqu'il s'agit de la troisième réaction étudiée). Il a été trouvé que $n \approx 1,9$ et que $k_{3\text{mg chlorophylle/ml}} \approx 5 \cdot 10^4 \text{ litre} \cdot \text{mole}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (exprimé par rapport au produit de la réaction de récupération). La réaction se rapproche donc du second ordre.

Une autre transformation graphique a été essayée. Si l'on multiplie les valeurs d'ordonnée de la figure 31 par le temps correspondant, et que l'on porte le produit ainsi obtenu en fonction du temps, on obtient les courbes de la figure 33. On constate que, sauf vers l'origine, les points se répartissent sur une droite. Il est possible de trouver des équations qui expliqueraient cette allure des courbes : à une fonction linéaire il faut ajouter un terme positif qui deviendra négligeable dès que le temps sera assez grand. Il est plus intéressant, néanmoins, de trouver une équation traduisant un mécanisme de réaction.

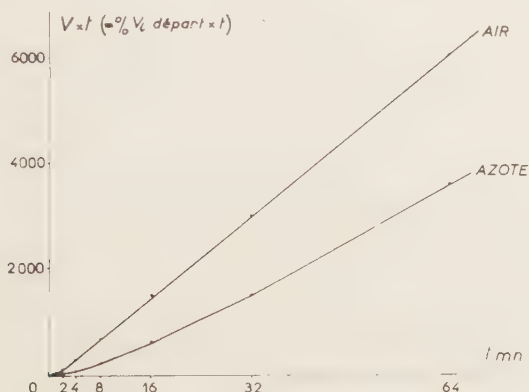
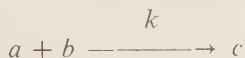


FIG. 33. — Transformation de la courbe de la figure 31.

En ordonnée : produit du temps (durée de l'intervalle d'obscurité) par le pourcentage de la vitesse initiale du nouveau jet (par rapport au premier).

En supposant que la récupération est une réaction bimoléculaire on peut écrire :



où a et b sont les deux corps réagissants, c le produit de la réaction (mesuré par V , figure 33) et k la constante de vitesse.

A $t = 0$, $a = a_0$ et $b = b_0$; a_0 et b_0 n'étant pas nécessairement à la même concentration, on peut admettre $b_0 > a_0$, par exemple.

On peut poser l'équation de conservation

$$b_0 - b = a_0 - a,$$

soit

$$b = b_0 - a_0 + a$$

ou, si $\Delta = b_0 - a_0$, $b = \Delta + a$.

En écrivant que la vitesse de disparition de a obéit à la loi : $-\frac{da}{dt} = kab$,
on aura

$$-\frac{da}{dt} = ka(\Delta + a),$$

soit

$$-k dt = da \frac{1}{a(\Delta + a)}.$$

$\frac{1}{a(\Delta + a)}$ peut s'écrire

$$\frac{1}{\Delta} \frac{\Delta + a - a}{a(\Delta + a)} = \frac{1}{\Delta} \left(\frac{1}{a} - \frac{1}{a + \Delta} \right),$$

soit

$$-k \Delta dt = \frac{da}{a} - \frac{da}{a + \Delta} = \frac{da}{a} - \frac{d(a + \Delta)}{a + \Delta}$$

et

$$\int -k \Delta dt = \int \frac{da}{a} - \int \frac{d(a + \Delta)}{a + \Delta}.$$

Il en résulte que $-kt\Delta + C^{te} = \ln a - \ln(a + \Delta)$.

A $t = 0$, $C^{te} = \ln a_0 - \ln(a_0 + \Delta) = \ln \frac{a_0}{b_0}$; soit

$$-kt\Delta + \ln \frac{a_0}{b_0} = \ln \frac{a}{a + \Delta}$$

ou encore

$$-kt\Delta = \ln \frac{ab_0}{a_0(a + \Delta)} \quad \text{et} \quad \frac{ab_0}{a_0(a + \Delta)} = e^{-kt\Delta}.$$

En inversant, on obtient

$$\frac{a_0}{b_0} \frac{a + \Delta}{a} = e^{kt\Delta},$$

c'est-à-dire

$$1 + \frac{\Delta}{a} = \frac{b_0}{a_0} e^{kt\Delta}, \quad \text{soit} \quad \frac{\Delta}{a} = \frac{b_0}{a_0} e^{kt\Delta} - 1 \quad \text{et} \quad a = \Delta \frac{a_0}{b_0 e^{kt\Delta} - a_0}.$$

Par définition, $c = a_0 - a$, soit

$$\begin{aligned} c &= a_0 - \frac{\Delta a_0}{b_0 e^{kt\Delta} - a_0} = a_0 \left(1 - \frac{\Delta}{b_0 e^{kt\Delta} - a_0} \right) \\ &= a_0 \left[\frac{b_0 e^{kt\Delta} - a_0 - (b_0 - a_0)}{b_0 e^{kt\Delta} - a_0} \right] \\ &= a_0 \frac{b_0 e^{kt\Delta} - b_0}{b_0 e^{kt\Delta} - a_0} \\ &= a_0 \frac{e^{kt\Delta} - 1}{e^{kt\Delta} - \frac{a_0}{b_0}}. \end{aligned}$$

En posant $\frac{a_0}{b_0} = \Phi$, on obtient finalement

$$c = a_0 \frac{e^{kt\Delta} - 1}{e^{kt\Delta} - \Phi}.$$

Lorsque $t \rightarrow 0$, $e^{kt\Delta} \rightarrow 1$ et $c \rightarrow 0$;

quand $t \rightarrow \infty$, $\frac{e^{kt\Delta} - 1}{e^{kt\Delta} - \Phi} \rightarrow 1$ et $c \rightarrow a_0$. A $t = 0$, la concentration du complexe est nulle et la courbe de $c = f(t)$ admet une asymptote $= a_0$, ce qui est observé dans la figure 33 (où V mesure c).

IX. — INDUCTION DE LA RÉACTION DE HILL

RABINOWITCH (page 1375) indique qu'il n'a pas été observé d'induction en réaction de HILL. Or, les phénomènes d'induction sont rapides et les méthodes autrefois utilisées par les différents auteurs ne semblent pas être en mesure de les déceler. Aussi est-il apparu profitable de reprendre ces recherches à l'aide de la technique ampérométrique de dosage de l'oxygène. Cette étude paraissait d'autant plus intéressante qu'il est fort probable qu'au moins deux mécanismes de réactions de HILL existent.

En effet, ARNON et coll. (1961) ont publié un spectre d'action de la photoréduction du DPIP montrant un maximum à 644 m μ (certes, les conditions expérimentales de ces auteurs appellent certaines réserves). FORK (1963) a trouvé un épaulement vers 650 m μ et un maximum vers 680 m μ dans le spectre d'action de la réaction de HILL au FeCy. Enfin RUMBERG, MÜLLER et WITT (1962) admettent que la réduction du DPIP ne dépend que du système photochimique accessoire (sensibilisé par la chlorophylle b). Il est probable que cette distinction fonctionnelle peut

se traduire par une diversité cinétique. En particulier, il est possible que la réaction de HILL au FeCy, plus proche de la « photosynthèse » du point de vue photochimique que celle au DPIP, présente une induction du dégagement de l'oxygène.

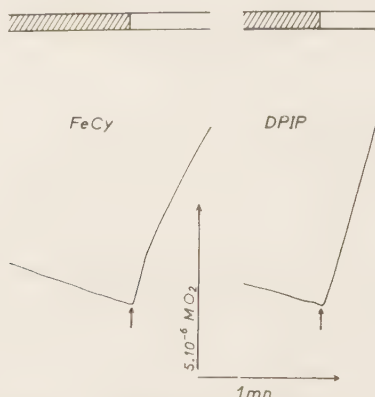


FIG. 34. — Enregistrement du début de la réaction de HILL.

Chloroplastes : 315 μg chlorophylle/ml dans TMS pH 6,6. Air, 15 °C.
 ↑ : lumière.
 FeCy : ferricyanure de potassium à 10^{-4} M ;
 DPIP : 2,6-dichlorophénol indophénol à $5 \cdot 10^{-5}$ M.

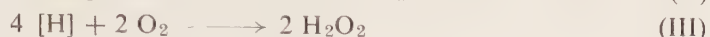
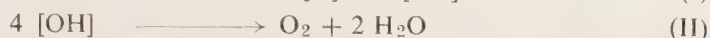
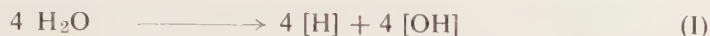
C'est ce qui est vérifié expérimentalement, ainsi que le montre la figure 34. On constate qu'en présence de FeCy, le dégagement d'oxygène, d'abord rapide, diminue après un temps à peu près égal à la durée du jet. La rupture de pente apparaît, d'ailleurs, lorsque la quantité d'oxygène libéré atteint approximativement le volume du jet. En présence de DPIP, il n'en est pas de même : le dégagement d'oxygène ne présente pas la diminution de vitesse trouvée avec le FeCy. D'autres expériences, faites en commun avec FORK confirment ces observations. Il faut noter, enfin, que la quantité d'oxygène libéré en présence d'une très faible concentration de FeCy est supérieure à ce qu'on pourrait attendre. Enfin LAVOREL a constaté une faible induction de la réaction de HILL chez *Chlorella* en présence de quinone (communication personnelle). Toutefois, il est évident qu'une étude plus fine, portant sur le dosage simultané de l'oxydant réduit et de l'oxygène dégagé permettra de mieux préciser cette diversité.

DISCUSSION

I. — DISCUSSION GÉNÉRALE

Au cours de ces recherches, on a pu montrer une relative similitude fonctionnelle des chloroplastes *in vitro* et *in vivo*. Ainsi, l'hypothèse du mécanisme cyclique de la photosynthèse, exposée dans l'« Introduction », a pu être étendue au cas des chloroplastes isolés. Bien que les meilleures conditions pour mettre ce cycle en évidence soient réalisées avec des chloroplastes en l'absence de réactif de HILL, il a été néanmoins possible de déceler une induction de la réaction de HILL au ferricyanure.

Les différents résultats obtenus appellent quelques remarques et conduisent à certaines conclusions. Avant de les passer en revue, il est utile de rappeler ici les 4 réactions écrites au paragraphe I - 2 des « Résultats » et se rapportant à la réaction de MEHLER :



1) Le dégagement d'oxygène peut se produire *antérieurement* à l'oxydation du photoproduit réducteur. Cela découle des expériences réalisées avec des chloroplastes sans réactif de HILL, dans lesquels le photoproduit oxydant et le photoproduit réducteur se mesurent tous les deux par des échanges d'oxygène. On constate, en effet, qu'à l'illumination il apparaît d'abord un dégagement limité d'oxygène et ensuite une absorption. Comme les quantités des photoproduits oxydés et réduits sont nécessairement égales, on est amené à conclure que la transformation de [OH] en O_2 ne dépend pas de l'oxydation de [H]. Sinon, le bilan total représenté par la réaction IV étant en faveur d'une absorption d'oxygène, on ne pourrait observer le jet. Ensuite seulement on peut déceler la photoabsorption. A ce propos, il faut signaler que cette photoabsorption ne se déroule pas à vitesse constante. On ne peut employer que pendant les 2 ou 3 premières minutes suivant le jet le terme de « vitesse stationnaire » (c'est dans ce domaine de temps qu'on la mesure). Après, on constate une diminution régulière de la vitesse qui finit par devenir égale à celle de l'endoabsorption. Peut-être y a-t-il un équilibre entre la synthèse et la dismutation de l'eau oxygénée. Mais il peut intervenir en plus un autre phénomène tel qu'une inactivation photochimique des chloroplastes ou un « empoisonnement » par l'eau oxygénée.

2) On suppose qu'une réaction de MEHLER intervient dans les conditions décrites ci-dessus, ce qui implique qu'une certaine quantité d'eau oxygénée s'accumule. Il a donc été tenté de mettre cette dernière en évidence. La méthode utilisée est celle du dosage colorimétrique du complexe $\text{Ti} - \text{H}_2\text{O}_2$. Il n'a pas été possible de trouver le rapport molaire théorique $\frac{\text{H}_2\text{O}_2}{\text{O}_2} = 2$ correspondant à la réaction IV. Dans quelques cas, les concentrations d'eau oxygénée étaient à la limite des erreurs de mesures. Dans d'autres, le rapport a pu être calculé et il approchait de 1,5. De toute façon l'action de la catalase exogène montre, par ailleurs, que très probablement il y a de l'eau oxygénée synthétisée.

Ces résultats justifient, d'une autre manière, l'hypothèse d'une photooxydation supplémentaire, parallèle à la réaction de MEHLER.

3) Il est difficile d'affirmer que les évolutions des photoproduits oxydant et réducteur sont indépendantes ou que c'est le départ de [OH] du complexe initial qui libère [H].

4) La fixation du substrat donnant [H] et [OH] s'opère probablement après le départ du photoproduit réducteur. Cette idée, contraire à celle émise par LAVOREL (1959), est rendue nécessaire, car on observe que la récupération est plus lente (légè-

rement, certes) que l'oxydation de [H]. Si la fixation du substrat était antérieure à cette oxydation, la récupération devrait suivre la même loi que celle régissant la disparition du photoproduit réducteur. Or ce n'est pas le cas.

5) La quantité totale d'oxygène dégagé pendant le jet, rapportée à la quantité totale de chlorophylle présente, est proche de celle observée chez *Chlorella* par JOLIOT (1961_a) : environ $7 \cdot 10^{-3}$ mole d'oxygène par mole de chlorophylle, soit 1 molécule d'oxygène dégagé pour environ 150 molécules de chlorophylle. Si l'on calcule ce rapport pour les deux chlorophylles séparément, on trouve environ $25 \cdot 10^{-3}$ M O₂/M chlorophylle *b* et environ $12 \cdot 10^{-3}$ M O₂/M chlorophylle *a*. Mais il est intéressant de noter que le pourcentage d'écart des chiffres de chaque expérience par rapport à la valeur moyenne donnée ci-dessus est maximal pour la chlorophylle *b* (jusqu'à 40 %) alors que ce pourcentage est moins élevé (25 à 30 %) pour la chlorophylle *a* et pour la chlorophylle totale. Enfin on constate que lorsque les feuilles sont peu pigmentées, ce qui se traduit par un faible « rendement brut d'extraction » (voir paragraphe I - 4 de « Matériel et Méthodes »), le rapport

$\frac{\text{O}_2}{\text{chlorophylle}}$ est grand, alors que l'inverse se produit avec des feuilles très vertes.

Cette constatation est à rapprocher des observations classiques sur la vitesse de la photosynthèse en fonction de la teneur en chlorophylle. On peut donc penser que seule une fraction limitée de la chlorophylle est « active » (cf. LAVOREL, 1959 et JOLIOT, 1961_a et _b) et que les conditions extérieures influent différemment sur la synthèse de la chlorophylle passive (transférante) et sur celle de la chlorophylle active (transformante). De plus, la grande irrégularité observée pour le rapport

$\frac{\text{O}_2}{\text{chlorophylle } b}$ suggère que même si c'est le système photochimique accessoire

(sensibilisé par la chlorophylle *b*) qui est responsable du jet (cf. FORK, 1963), celui-ci est lié à une certaine fraction active de la chlorophylle *a*, qui serait la seule active (FRENCH, 1961).

6) L'ancienne affirmation de l'absence d'induction de la réaction de HILL est due essentiellement aux méthodes employées. Toutefois, il semble bien qu'au moins deux mécanismes de cette réaction existent : l'un fait intervenir le système photochimique accessoire seul (cas du DPIP), l'autre exige la participation des systèmes photochimiques accessoire et principal. Ces deux mécanismes se distinguent également par leur comportement cinétique.

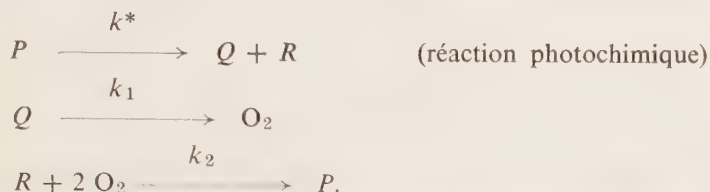
II. — INTERPRÉTATION ANALYTIQUE

On peut, en première approximation, considérer que la vitesse de récupération est à peu près égale à celle de l'oxydation du photoproduit réducteur, bien qu'en fait elle lui soit légèrement inférieure. Cela ne signifie pas, d'ailleurs, que les mécanismes de ces deux réactions sont identiques : on a vu, en effet, que la récupération suit une loi proche de celle du second ordre, par suite d'un processus très probablement bimoléculaire. Par contre, l'oxydation de [H] suit une loi du premier ordre bien qu'il s'agisse certainement aussi d'un processus bimoléculaire, mais dans lequel un des constituants, O₂, est en concentration très grande par rapport à l'autre, [H].

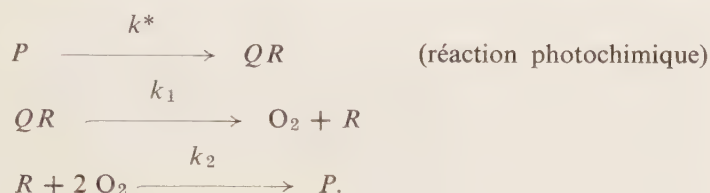
Dans ces conditions, on peut imaginer au moins deux modèles cinétiques (étant donné la remarque du paragraphe I - 3 de ce chapitre). Pour ces deux modèles,

P représente le complexe initial, Q le photoproduit oxydant et R le photoproduit réducteur.

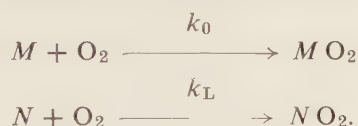
I. Les évolutions du photoproduit oxydant et du photoproduit réducteur sont indépendantes :



II. L'évolution du photoproduit réducteur est conditionnée par celle du photoproduit oxydant :



Si l'on désigne le substrat de l'endoabsorption par M et celui de la photooxydation supplémentaire par N , on a pour les deux modèles :



Il est normal d'admettre que l'endoabsorption a également lieu à la lumière. La photoabsorption brute observée est donc la résultante des réactions des modèles I ou II ainsi que de l'endoabsorption et de la photooxydation.

L'endoabsorption est d'ordre nul ; on peut admettre qu'il en est de même pour la photooxydation supplémentaire, soit :

$$-\frac{dM}{dt} = k_0$$

et
$$-\frac{dN}{dt} = k_L.$$

Les modèles I et II donnent :

$$\begin{aligned} \text{I.} \quad & -\frac{dP_d}{dt} = k^*P = +\frac{dQ_f}{dt} = +\frac{dR_f}{dt} \\ & -\frac{dQ_d}{dt} = k_1Q \\ & -\frac{dR_d}{dt} = k_2R = +\frac{dP_f}{dt}; \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{II.} \quad & -\frac{dP_d}{dt} = k^*P = +\frac{dQR_f}{dt} \\
 & -\frac{dQR_d}{dt} = k_1QR = +\frac{dR_f}{dt} \\
 & -\frac{dR_d}{dt} = k_2R = +\frac{dP_f}{dt}.
 \end{aligned}$$

Les indices d et f signifient, respectivement, *détruit* et *formé*.

Le bilan global des échanges d'oxygène, $\frac{dO_2}{dt}$, dépendra donc de ces différentes réactions postulées.

On pourrait exprimer par une équation différentielle les différentes réactions supposées. Mais une telle équation serait difficile à transcrire directement. Aussi procède-t-on plus simplement en confondant les différentielles avec des différences, en traitant chaque équation séparément et en se servant des résultats du temps t pour calculer ceux du temps $t + \Delta t$.

Par ailleurs, on suppose que le dégagement d'oxygène s'arrête dès la remise à l'obscurité, ce qui correspond aux faits expérimentaux, et qu'il en est de même pour la photooxydation supplémentaire (ce qui est, par contre, moins établi).

Dans ces conditions, on écrit que pendant l'intervalle de temps Δt on observe les variations suivantes.

1) A l'obscurité :

$$-\Delta M = k_0 = \Delta O_2.$$

2) A la lumière :

$$-\Delta M = k_0$$

$$-\Delta N = k_L;$$

on a aussi

$$-\Delta P = k^*P$$

et

$$-\Delta Q = k_1Q \quad (\text{modèle I})$$

ou

$$-\Delta QR = k_1QR \quad (\text{modèle II})$$

ainsi que

$$-\Delta R = k_2R$$

(ce qui entraîne la reformation d'une quantité équivalente de P) ;

soit

$$\Delta O_2 = -\Delta M - \Delta N + \Delta Q - 2\Delta R \quad (\text{modèle I})$$

ou

$$\Delta O_2 = -\Delta M - \Delta N + \Delta QR - 2\Delta R \quad (\text{modèle II}) ;$$

on a également

$$P_t = P_{t-1} - \Delta P_{t-1} + \Delta R_{t-1}$$

et

$$Q_t = Q_{t-1} - \Delta Q_{t-1} + \Delta P_t \quad (\text{modèle I})$$

$$\text{ou} \quad QR_t = QR_{t-1} - \Delta QR_{t-1} + \Delta P_t \quad (\text{modèle II})$$

$$\text{ainsi que} \quad R_t = R_{t-1} - \Delta R_{t-1} + \Delta P_t \quad (\text{modèle I})$$

$$\text{ou} \quad R_t = R_{t-1} - \Delta R_{t-1} + \Delta QR_t \quad (\text{modèle II}).$$

3) A la remise à l'obscurité :

$$-\Delta M = k_0$$

$$-\Delta R = k_2 R = +\Delta P,$$

$$\text{soit} \quad \Delta O_2 = -\Delta M - 2\Delta R ;$$

$$\text{par ailleurs} \quad P_t = P_{t-1} + \Delta R_{t-1}$$

$$\text{et} \quad R_t = R_{t-1} - \Delta R_{t-1}.$$

Les courbes des figures 35 et 36 d'une part, 37 d'autre part, se rapportent à des exemples numériques obtenus à partir des équations ci-dessus.

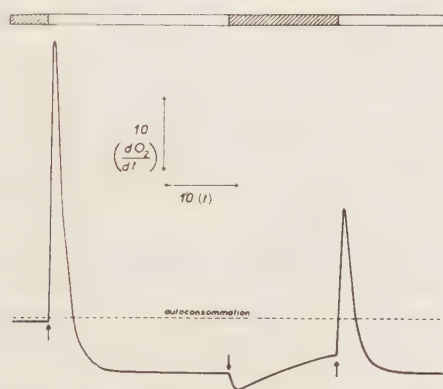


FIG. 35. — Courbe théorique des vitesses d'échanges d'oxygène par les chloroplastes isolés, en l'absence de réactif de HILL.

Vitesse $\frac{dO_2}{dt}$ et temps t en unités arbitraires.

↑ : lumière ;

↓ : obscurité.

Détails dans le texte.

Comparer avec la figure 7.

— Figures 35 et 36.

Avant l'illumination ($t = 0$), $P_0 = 100$. De plus $k_L = 4 k_0$ et $k_1 = 10 k_2$ (ce qui correspond approximativement aux résultats expérimentaux). On pose :

$$k_0 = 0,5$$

$$k^* = 1$$

(c'est-à-dire que dès $t = t_0 + \Delta t$, tout P est transformé en QR ou $Q + R$)

$$k_1 = 0,5$$

$$k_2 = 0,05.$$

Seul le cas du modèle I est examiné ici.

La courbe de la figure 35 a été obtenue en portant ΔO_2 en $f(t)$ et celle de la figure 36 en donne l'intégrale, c'est-à-dire $O_2 = f(t)$. On remarque l'analogie avec les courbes expérimentales des figures 7 et 6, respectivement.

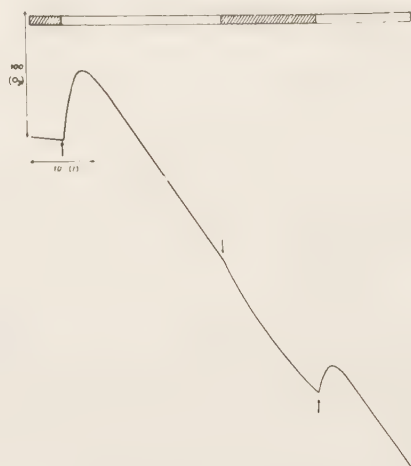


FIG. 36. — Courbe théorique des échanges d'oxygène (mesurés par des variations de quantités) par les chloroplastes isolés, en l'absence de réactif de HILL.

Quantité maximale d'oxygène pouvant être dégagé par le jet : 100 en unités arbitraires.
Temps t en unités arbitraires.

↑ : lumière ;
↓ : obscurité.

Cette courbe représente l'intégrale de la courbe de la figure 35.
Comparer avec la figure 6.

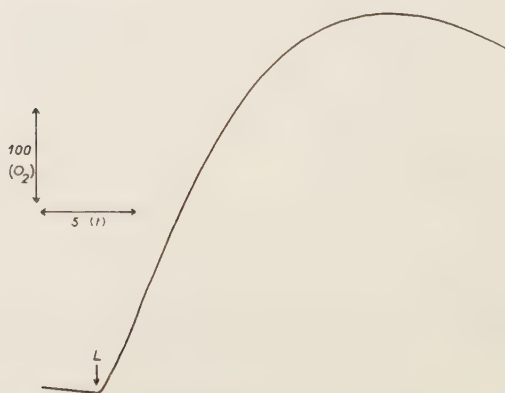


FIG. 37. — Courbe théorique des échanges d'oxygène (mesurés par des variations de quantités) par les chloroplastes isolés, en l'absence de réactif de HILL et en lumière limitante.

Quantité maximale d'oxygène pouvant être dégagé pendant le jet = 1 000 en unités arbitraires. Temps t en unités arbitraires. L : lumière.
Comparer avec la figure 17.

— Figure 37.

Avant l'illumination ($t = 0$), $P_0 = 1\,000$. De plus, $k_L = 2k_0$ ainsi que $k_1 = 10k_2$. On pose aussi :

$$k_0 = 2$$

$$k^* = 0,5$$

$$k_1 = 0,1$$

$$k_2 = 0,01.$$

Seul également le cas du modèle I est examiné ici.

La vitesse de la réaction photochimique n'est plus assez grande pour considérer qu'à la lumière la concentration de P soit à peu près nulle.

On obtient ainsi une courbe du jet présentant une allure sigmoïde fréquemment observée en faible lumière (cf. fig. 17).

Si l'on suit l'évolution théorique de R dans le cas du modèle II, on constate que la vitesse de la photoabsorption nette d'oxygène augmente progressivement (ce qui est d'ailleurs aussi le cas dans les conditions choisies pour construire la courbe de la figure 37). L'allure générale de la courbe exprimant le ΔO_2 total est toutefois peu modifiée.

Il est donc possible d'obtenir, à partir de modèles cinétiques théoriques, des courbes calculées proches de celles qui sont issues de l'expérience.

III. — INTERPRÉTATION FONCTIONNELLE

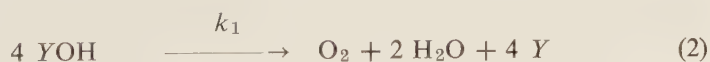
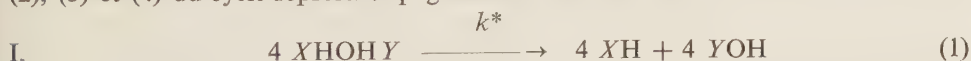
1. Hypothèse d'un complexe initial de concentration limitante

Bien que l'on n'ait pu déterminer la nature des substrats et des produits intervenant dans l'endoabsorption et dans la photooxydation supplémentaire, il est possible de proposer un système rendant compte des résultats.

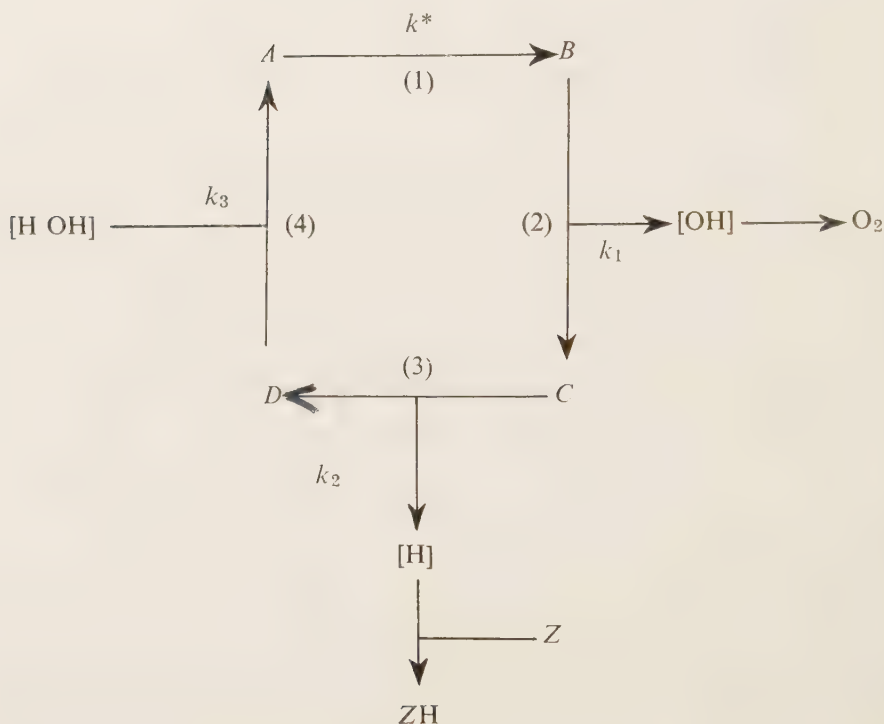
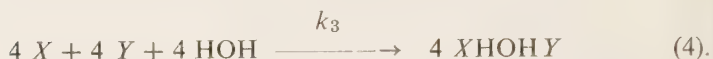
On voit que le cycle à trois étapes postulé au départ explique, dans l'ensemble, les phénomènes observés. Toutefois, il est plus correct de lui substituer un cycle à quatre étapes du type indiqué page suivante.

On désigne par X et Y des transporteurs hypothétiques du photoproduit réducteur $[H]$ et du photoproduit oxydant $[OH]$, par Z un accepteur d'électrons s'accumulant sous forme réduite ZH . HOH est le substrat donnant $[H]$ et $[OH]$. Lié à X et Y , HOH forme le complexe initial $XHOHY$. Les écritures $XHOHY$, HX et YOH n'impliquent nullement que telle est la vraie nature de ces produits postulés (on peut aussi représenter le complexe initial par XOH Y et le photoproduit réducteur par X^-).

Les deux modèles théoriques (I et II) peuvent être examinés. Les réactions (1), (2), (3) et (4) du cycle représenté page suivante deviennent :



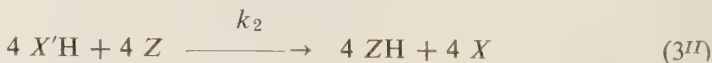
II.

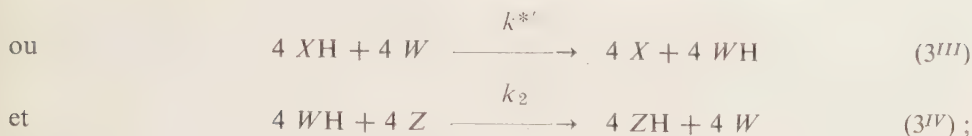


Une seule réaction photochimique figure dans les deux modèles, étant donné que les expériences entreprises ne mettent en évidence qu'un acte photochimique global. Néanmoins, il n'est pas impossible d'intégrer les résultats récents impliquant l'existence de *deux systèmes pigmentaires* (cf. DUYSSENS, AMESZ et KAMP, 1961 ; FRENCH, 1961 ; ARNON et coll. 1962 ; RUMBERG, MÜLLER et WITT, 1962 et les Actes du « Colloque International du Centre National de la Recherche Scientifique n° 119 » sur la Photosynthèse, C.N.R.S. éd., Paris, sous presse). On peut admettre, en effet, que la réaction (3) est précédée d'une deuxième réaction photochimique (de constante de vitesse $k^{*'}).$ On a :



et





W représente un transporteur d'électrons endogène.

La réaction (3) proprement dite serait donc (3^{II}) ou (3^{IV}) .

L'introduction d'une deuxième réaction photochimique mène à la conclusion que la récupération ne dépend pas directement de l'oxydation de Z , bien qu'évidemment le cycle sera bloqué au second tour si W n'est pas régénéré. Comme la nature de W est aussi hypothétique que celle de X , il n'est pas possible de dissiper actuellement l'incertitude.

Des équations posées ci-dessus :

(1), (2), (3) et (4) ou

(1), (2), (3^I) , (3^{II}) et (4) ou

(1), (2), (3^{III}) , (3^{IV}) et (4)

on peut penser *a priori* que seules celles qui font intervenir Z auront des caractéristiques différentes suivant la nature de l'accepteur d'électrons. Ainsi, en photosynthèse au sens classique du terme, $Z = \text{CO}_2$; en réaction de HILL, $Z = \text{DPIP}$ ou FeCy , par exemple ; enfin, dans le cas des chloroplastes en l'absence d'accepteur de HILL, $Z = \text{O}_2$. Cette diversité de Z se traduira par une diversité de la vitesse de la réaction (3). Il en résulte un aspect différent de l'induction. Dans un cas, on voit un jet net (photosynthèse), dans un autre, il n'est pratiquement pas décelable (réaction de HILL au DPIP). Mais il est également possible d'observer un cas intermédiaire entre ces deux extrêmes (réaction de HILL au FeCy).

Ce raisonnement suppose que la vitesse de la réaction (4) de reformation du complexe initial n'est pas limitante. Or, il a été montré que cette réaction est la plus lente (expériences avec les chloroplastes sans réactif de HILL). Mais cette vitesse a été calculée avec des chloroplastes remis à l'obscurité et elle n'est pas nécessairement la même à la lumière. La possibilité pour la récupération d'être plus rapide à la lumière est étayée par les travaux de FORK (1963) à propos de l'influence du proche infra-rouge sur la réapparition du jet. Les résultats obtenus par JOLIOT (1963) mènent à une conclusion identique. Toutefois, il est possible qu'il ne s'agisse pas d'une réaction photochimique spéciale à la récupération, étant donné l'analogie du spectre d'action obtenu par FORK avec celui récemment donné pour l'effet EMERSON par MYERS et GRAHAM (1963).

Ces diverses remarques ne modifient pas fondamentalement l'explication proposée pour le fonctionnement cyclique de l'appareil photosynthétique. Il faut rappeler, d'ailleurs, que les équations écrites ne présentent pas d'originalité particulière par rapport à celles fournies depuis longtemps par FRANCK (cf. RABINOWITCH). Mais il a été possible, ici, de montrer la probabilité de l'existence de ces réactions et d'en déterminer les caractéristiques cinétiques. Bien entendu, chacune des étapes présentées peut être en réalité plus complexe qu'il n'a été décrit.

Pour les chloroplastes isolés et sans réactif de HILL ($Z = O_2$), la figure 38 résume deux schémas rendant compte des phénomènes observés et se rapportant aux modèles cinétiques théoriques I et II.

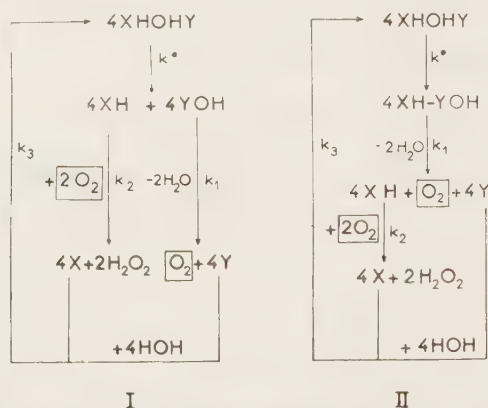


FIG. 38. — Schéma du fonctionnement cyclique de l'appareil photochimique pour les chloroplastes isolés, en l'absence de réactif de HILL.

I et II : voir dans le texte.

X et Y : transporteurs hypothétiques du photoproduit réducteur $[H]$ et du photoproduit oxydant $[OH]$;

$XHOHY$: complexe initial hypothétique ;

HOH : substrat donnant $[H]$ et $[OH]$.

k^* : constante de vitesse de la réaction photochimique ;

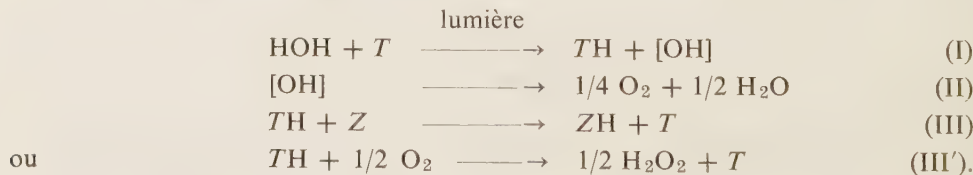
k_1, k_2, k_3 : constantes de vitesse des réactions thermiques.

2. Hypothèse d'un accepteur endogène primaire d'électrons de concentration limitante

La première explication proposée de l'origine du jet est, on l'a vu, l'existence d'un précurseur présent en petite quantité dans les chloroplastes (*complexe initial*).

Une autre interprétation possible est que le précurseur d'oxygène ne serait pas en concentration limitante. Ce serait un accepteur endogène primaire d'électrons (T) qui existerait en très faible concentration. Il n'est même plus nécessaire alors de faire intervenir l'hypothèse d'un complexe initial.

En effet, au début de l'illumination, on assisterait à une « microréaction » de HILL avec T , selon la séquence hypothétique suivante :



La régénération de T , rendue éventuellement possible par les réactions (III) ou (III'), permettrait à l'appareil photosynthétique de continuer à fonctionner.

Si les réactions (III) ou (III') sont plus lentes que la réaction (II), on pourra observer un jet dont l'amplitude mesurera la concentration de T .

Du point de vue cinétique, on ne peut, à première vue, choisir entre les deux hypothèses proposées.

Toutefois, la particularité de la récupération s'intègre mieux dans le cadre de la théorie du précurseur. Il n'y a d'ailleurs pas de vraie contradiction entre les deux hypothèses, étant donné qu'elles peuvent, en fait, se compléter l'une l'autre.

IV. — MODIFICATIONS A APPORTER AU CONCEPT INITIAL

A l'aide de l'électrode de mesure directe des vitesses d'échange d'oxygène construite par GINGRAS et dont il a été question plus haut (paragraphe I - 1 des « Résultats »), des expériences ont été faites, mais avec des chloroplastes directement au contact de l'électrode de platine (électrode « nue »). On obtient ainsi un temps de réponse bien meilleur qu'avec l'électrode recouverte de la membrane de « teflon ».

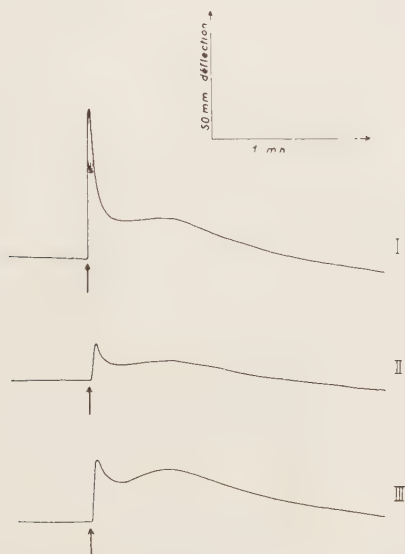


FIG. 39. — Enregistrement des échanges d'oxygène par les chloroplastes isolés, en l'absence de réactif de Hill. (Électrode nue de mesure directe des vitesses).

Chloroplastes : 1 mg chlorophylle/ml dans TMS pH 6,6. Azote. 15 °C. Lumière blanche.

I : enregistrement obtenu lors de la première illumination ;

II : enregistrement obtenu lors d'une nouvelle illumination suivant immédiatement un intervalle d'obscurité de 11 mn après la première illumination ;

III : enregistrement obtenu en remplaçant l'intervalle d'obscurité de l'expérience II par une illumination à 720 mμ pendant 11 mn également.

Dans ces conditions, il a été constaté sur les enregistrements qu'à un « pic », correspondant au maximum de vitesse du jet, succède une « bosse » (fig. 39). Cette bosse traduit une nouvelle variation, plus lente, de la vitesse du dégagement d'oxygène. De plus, après un intervalle d'obscurité, on remarque que le rapport de la hauteur du pic à celle de la bosse est plus faible que lors de la première illumination. La diminution du rapport est encore plus nette si l'on remplace l'intervalle d'obscurité

par une période d'éclairement à 720 m μ , bien que le pic soit exalté ainsi que l'a constaté FORK (1963).

L'allure des courbes de la figure 39 présente une parenté avec celles obtenues par ŠERLÍK avec des algues (1957_a et _b). Le comportement des chloroplastes isolés est donc encore plus analogue à celui des organismes entiers. Il subsiste cependant entre leurs inductions respectives des différences quantitatives et même qualitatives dont la signification reste encore obscure.

La présence de la deuxième vague d'induction correspondant à la bosse peut être due à des phénomènes autocatalytiques (cf. RABINOWITCH, ch. 33, et ŠERLÍK, 1957_a et _b). Cependant, dans le cas des chloroplastes isolés et sans réactif de HILL, ce n'est probablement pas le cycle du carbone qui en serait responsable. D'après BANNISTER, un processus d'autocatalyse, par exemple l'activation d'une enzyme, pourrait être la cause de ces vagues d'induction (communication personnelle). Il ne s'agit là, malheureusement, que de considérations encore théoriques et de nombreuses expériences restent à faire pour les confirmer ou les infirmer.

V. — CONCLUSION

Les différentes recherches entreprises au cours de ce travail et les résultats qui en découlent ont permis de préciser le mécanisme fonctionnel régissant l'activité photosynthétique des chloroplastes *in vitro*.

On a pu constater que ce mécanisme n'est pas foncièrement différent de celui se rapportant aux chloroplastes *in vivo* et que les particularités observées sont probablement dues, au moins en partie, à des caractéristiques cinétiques particulières selon l'état des chloroplastes et les conditions du milieu réactionnel.

Cette étude a porté essentiellement sur les échanges d'oxygène. Il serait souhaitable de l'étendre dans d'autres directions, telles que : la fluorescence de la chlorophylle, la photoréduction de divers oxydants, la photophosphorylation et enfin la photosynthèse complète réalisée par un système reconstitué.

REMERCIEMENTS

Attaché de recherche au Centre National de la Recherche Scientifique, j'ai entrepris ce travail au Laboratoire de Photosynthèse du C.N.R.S.. Monsieur le Professeur A. MOYSE, directeur du laboratoire, a bien voulu me confier le sujet qui m'a amené à cette thèse. Je le remercie sincèrement pour l'accueil qu'il m'a réservé et pour la grande liberté qu'il m'a accordée, me permettant ainsi de prendre contact avec différents aspects de la recherche scientifique. Je le remercie également de l'intérêt qu'il a porté à mes résultats et des nombreuses critiques qu'il m'a prodiguées.

Ma gratitude va de même à Monsieur J. LAVOREL, sous-directeur du laboratoire et Maître de Conférences à la Sorbonne, sans qui ces recherches n'auraient pu être poursuivies comme elles l'ont été. Son amitié m'est chère et sa large expérience a été pour moi d'un très grand apport.

Je remercie aussi Monsieur le Professeur R. ULRICH qui a accepté d'être mon « parrain » auprès du C.N.R.S. et qui m'a accordé l'honneur de présider mon jury.

Je dois beaucoup à Madame M. STRAUB qui a été pour moi une précieuse collaboratrice, à Monsieur R. SIMIER qui a réalisé une grande partie de mon appareillage et à Monsieur B. VANBIERVLIET qui a porté toute son attention à mes cultures.

Enfin, j'ai tiré un grand profit des nombreuses discussions que j'ai eues avec mes camarades du laboratoire. Qu'ils trouvent tous ici l'expression de ma reconnaissance pour leur aide et leur cordialité.

BIBLIOGRAPHIE

- ALLEN M.B., WHATLEY F.R. et ARNON D.I., 1958. – Photosynthesis by isolated chloroplasts. VI. Rates of conversion of light into chemical energy in photosynthetic phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta*, **27**, 16-23.
- ARNON D.I., 1938. – Micro-elements in culture solution experiments with higher plants. *Am. J. Botany*, **25**, 322-325.
- ARNON D.I., 1949. – Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.*, **24**, 1-15.
- ARNON D.I., ALLEN M.B. et WHATLEY F.R., 1956. – Photosynthesis by isolated chloroplasts. IV. General concept and comparison of three photochemical reactions. *Biochim. Biophys. Acta*, **20**, 449-461.
- ARNON D.I., LOSADA M., WHATLEY F.R., TSUJIMOTO H.Y., HALL D.O. et HORTON A.A., 1961. – Photosynthetic phosphorylation and molecular oxygen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **47**, 1314-1334.
- AVRON M., 1960. – Photophosphorylation by Swiss-chard chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, **40**, 257-272.
- AVRON M. et JAGENDORF A.T., 1959. – Evidence concerning the mechanism of adenosine triphosphate formation by spinach chloroplasts. *J. Biol. Chem.*, **234**, 967-972.
- AVRON M., JAGENDORF A.T. et EVANS M., 1957. – Photosynthetic phosphorylation in a partially purified system. *Biochim. Biophys. Acta*, **26**, 262-269.
- BASSHAM J.A. et CALVIN M., 1957. – *The path of carbon in photosynthesis*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs. (Traduction en français chez Dunod, Paris, 1959).
- BLINKS L.R. et SKOW R.K., 1938. – The time course of photosynthesis as shown by a rapid electrode method for oxygen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **24**, 420-427.
- BRUINSMAN J., 1961. – A comment on the spectrophotometric determination of chlorophyll. *Biochim. Biophys. Acta*, **52**, 576-578.
- CALVIN M. et BASSHAM J.A., 1962. – *The photosynthesis of carbon compounds*. W.A. Benjamin, New York.
- CARRIT D.E. et KANWISHER J.W., 1959. – An electrode system for measuring dissolved oxygen. *Anal. Chem.*, **31**, 5-9.
- CHARLOT G. et GAUGUIN R., 1952. – *Dosages colorimétriques*. Masson et Cie éd., Paris.
- CLARK L.C. (Jr), WOLF R., GRANGER D. et TAYLOR Z., 1953. – Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography. *J. Appl. Physiol.*, **6**, 189-193.
- DUYSSENS L.N.M., AMESZ J. et KAMP B.M., 1961. – Two photochemical systems in photosynthesis. *Nature*, **190**, 510-511.
- FORK D.C., 1963. – The influence of a HILL oxidant on the action spectrum for oxygen production in Swiss-chard chloroplasts. *Colloq. Intern. Centre Natl. Rech. Sci. Paris*, n° **119**, sous presse.
- FRANCK J., 1945. – Photosynthetic activity of isolated chloroplasts. *Rev. Mod. Phys.*, **17**, 112-119.
- FRENCH C.S., 1961. – Light, pigments and photosynthesis. in *Light and Life*, W.D. McELROY and B. GLASS ed., Johns Hopkins Press, Baltimore, 447-472.
- GALSTON A.W.G., BONNICHSEN R.K.B. et ARNON D.I., 1951. – The preparation of highly purified spinach leaf catalase. *Acta Chem. Scand.*, **5**, 781-790.
- GINGRAS G., LEMASSON C. et FORK D.C., 1963. – A study of the mode of action of 3-(4-chlorophenyl)-1,1-dimethylurea on photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta*, **69**, 438-440.
- HAXO F.T. et BLINKS L.R., 1950. – Photosynthetic action spectra of marine algae. *J. Gen. Physiol.*, **33**, 389-422.
- HILL R., 1937. – Oxygen evolved by isolated chloroplasts. *Nature*, **139**, 881-882.
- HILL R. et WALKER D.A., 1959. – Pyocyanine and photophosphorylation with chloroplasts. *Plant Physiol.*, **34**, 240-245.
- HODGMAN C.D., WEAŠT R.C. et SELBY S.M., 1961-1962. – *Handbook of Chemistry and Physics*. 43rd edition. The Chemical Rubber Publishing Co., Cleveland, pages 3429 et 1706.
- HOMES M.V., ANSIAUX J.R. et VAN SCHOOR G., 1953. – *Aquiculture*. Laconti éd., Bruxelles.
- JAGENDORF A.T. et AVRON M., 1959. – Inhibitors of photosynthetic phosphorylation in relation to electron and oxygen transport pathways of chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.*, **80**, 246-257.

- JAGENDORF A.T. et WILDMAN S.G., 1954. - Proteins of green leaves. VI. Centrifugation of tobacco leaf homogenates and some properties of isolated chloroplasts. *Plant Physiol.*, **29**, 270-279.
- JOLIOT P., 1961_a. - Cinétique d'induction de la photosynthèse chez *Chlorella pyrenoidosa*. I. Etude des phases transitoires de la photosynthèse consécutives à une variation d'éclairement. *J. Chim. Phys.*, **58**, 570-583.
- JOLIOT P., 1961_b. - Cinétique d'induction de la photosynthèse chez *Chlorella pyrenoidosa*. II. Cinétique d'émission d'oxygène et fluorescence pendant la phase initiale d'illumination. *J. Chim. Phys.*, **58**, 584-595.
- JOLIOT P., 1963. - Etude des cinétiques d'induction chez *Chlorella pyrenoidosa*. *Colloq. Intern. Centre Natl. Rech. Sci. Paris*, n° **119**, sous presse.
- KOLTHOFF I.M. et LINGANE J.J., 1952. - *Polarography*. Interscience Pub., New York, vol. **I** et **II**.
- DE KOUCHKOVSKY Y., 1959. - Sur la présence ou l'absence de la cytochrome-oxydase dans les chloroplastes isolés. *Compt. Rend.*, **248**, 3597-3599.
- DE KOUCHKOVSKY Y., 1961. - Sur les oxydations réalisées à l'obscurité et à la lumière par les chloroplastes isolés. *Compt. Rend.*, **252**, 611-613.
- DE KOUCHKOVSKY Y., 1961. - Mise en évidence d'un dégagement transitoire d'oxygène par les chloroplastes isolés. Résumé n° 22-28 - 2269. *V^e Congr. Intern. de Biochim., Moscou 10-16 août 1961*. Pergamon Press, Oxford, page 449.
- DE KOUCHKOVSKY Y., 1962. - Induction des phénomènes photochimiques dans les chloroplastes isolés. *Biochim. Biophys. Acta*, **59**, 247-249.
- DE KOUCHKOVSKY Y., 1963. - Induction, dans les chloroplastes isolés, des réactions photosynthétiques mesurées par les échanges d'oxygène. *Colloq. Intern. Centre Natl. Rech. Sci. Paris*, n° **119**, sous presse.
- LAVOREL J., 1956. - Photoinhibition de la catalase des chloroplastes. *Biochim. Biophys. Acta*, **22**, 226-237.
- LAVOREL J., 1959. - Induction and fluorescence in quinone poisoned *Chlorella* cells. *Plant Physiol.*, **34**, 204-209.
- MACKINNEY G., 1941. - Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. Biol. Chem.*, **140**, 315-322.
- MEHLER A.H., 1951. - Studies on reactions of illuminated chloroplasts. I. Mechanism of the reduction of oxygen and other HILL reagents. *Arch. Biochem. Biophys.*, **33**, 65-77.
- MEHLER A.H., 1951. - Studies on reactions of illuminated chloroplasts. II. Stimulation and inhibition of the reaction with molecular oxygen. *Arch. Biochem. Biophys.*, **34**, 339-351.
- MEHLER A.H. et BROWN A.H., 1952. - Studies on reactions of illuminated chloroplasts. III. Simultaneous photoproduction and consumption of oxygen studied with oxygen isotopes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **38**, 365-370.
- MYERS J. et GRAHAM J.R., 1963. - Enhancement in *Chlorella*. *Plant Physiol.*, **38**, 105-116.
- PESSON H., 1961. - General method of plotting kinetic data for reactions of any order. *Science*, **134**, 676-677.
- RABINOWITCH E. - *Photosynthesis and related processes*. Interscience Pub., New York, vol. **I** (1945), vol. **II-1** (1951), vol. **II-2** (1956).
- RAYMENT R.B., 1962. - Temperature effect on the polarographic oxygen electrode. *Anal. Chem.*, **34**, 1089-1090.
- RUMBERG B., MÜLLER A. et WITT H.T., 1962. - New results about the mechanism of photosynthesis. *Nature*, **194**, 854-856.
- SAN PIETRO A., 1961. - Photochemical reduction of triphosphopyridine nucleotide by illuminated chloroplasts. in *Light and Life*, W.D. MacElroy and B. Glass ed., Johns Hopkins Press, Baltimore, 631-641.
- ŠETLÍK I., 1957_a. - Periodic phenomena in photosynthesis as reflected by oxygen exchange of blue-green algae. *Biochim. Biophys. Acta*, **24**, 434-435.
- ŠETLÍK I., 1957_b. - Light-dark transients in oxygen exchange of blue-green algae. *Biochim. Biophys. Acta*, **24**, 436-437.
- THOMAS J.B., VOSKUIL W., OLSMAN H. et DE BOOIS H.M., 1962. - Fluorescence - induction phenomena in isolated chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, **59**, 224-226.
- VEJLBY K., 1960. - Induction phenomena in photosynthesis of isolated chloroplasts. *Nature*, **186**, 652-653.

Table des Matières

RÉSUMÉ	15
SUMMARY	15
INTRODUCTION	16
MATÉRIEL ET MÉTHODES	18
I. Préparation des chloroplastes isolés	18
1. Culture	18
2. Extraction des chloroplastes	19
3. Dosage des pigments	21
4. Rendement brut d'extraction	22
II. Préparation des tampons, des réactifs et des gaz	22
1. Tampons à différents pH	22
2. Réactifs	22
3. Gaz	22
III. Dispositif de mesure des échanges d'oxygène	22
1. Dosage ampérométrique de l'oxygène dissous en milieu liquide.....	22
a) Principe	23
b) Réactions aux électrodes	24
c) Equations électrochimiques simplifiées	24
2. Montage expérimental	27
a) Appareillage.....	27
b) Caractéristiques du montage expérimental	30
RÉSULTATS	32
I. Mise en évidence de l'induction	32
1. Enregistrements	32
2. Interprétation	32
3. Modes de calculs graphiques	34
II. Influence de facteurs biologiques et physiques	36
1. Origine spécifique et mode d'obtention des préparations de chloroplastes ..	36
2. Age des préparations de chloroplastes	37
3. Concentration en chloroplastes	38
III. Influence de facteurs chimiques	38
1. Inhibiteurs	38
2. Transporteurs d'électrons	40
IV. Activité catalasique des chloroplastes et influence de la catalase exogène.....	42
1. Mesure de l'activité catalasique	42
2. Influence de la catalase exogène sur les échanges d'oxygène par les chloroplastes	43
V. Influence de l'éclairement	46
VI. Influence du pH.....	47
VII. Influence de la température.....	50
VIII. Analyse cinétique	55
IX. Induction de la réaction de HILL	61
DISCUSSION	62
I. Discussion générale	62
II. Interprétation analytique	64
III. Interprétation fonctionnelle	69
1. Hypothèse d'un complexe initial de concentration limitante.....	69
2. Hypothèse d'un accepteur endogène primaire d'électrons de concentration limitante	72
IV. Modifications à apporter au concept initial	73
V. Conclusion	74
BIBLIOGRAPHIE	75

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

La pluralité des réactions photochimiques en photosynthèse

Vu et approuvé :

Paris, le 13 mai 1963

Le Doyen de la Faculté des Sciences

Marc ZAMANSKY

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris

Jean ROCHE

IMPRIMÉ EN FRANCE
IMP. MARCEL BON - VESOUL
DÉPOT LÉGAL: IMP. 997-II-63
—— ÉDITEUR 1146 ——

